

Philipps



**Universität
Marburg**

**Die zentrale Vakuole von *Phaeodactylum tricornutum*:
Charakterisierung
und
Untersuchung des Proteintransports**

Dissertation zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

M. Sc.

Viktoria Schreiber

aus Berlin

Marburg/Lahn 2018

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180)
als Dissertation angenommen am: 23.04.2018

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe-G. Maier

Zweitgutachter Prof. Dr. Susanne Önel

Prof. Dr. Martin Thanbichler

Prof. Dr. Andreas Brune

Tag der Disputation am: 14.09.2018

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Schreiber, V; Dersch, J; Puzik, K; Bäcker, O; Liu, X; Stork, S; Schulz, J; Heimerl, T; Klingl, A; Zauner, S; Maier, U (2017): The Central Vacuole of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Identification of New Vacuolar Membrane Proteins and of a Functional Di-leucine-based Targeting Motif. In: *Protist* 168 (3), S. 271–282.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Endosymbiontentheorie.....	1
1.1.1 Die Entstehung photosynthetisch aktiver Eukaryoten – die Primäre Endosymbiose	1
1.1.2 Die Entstehung der Chromalveolaten – die sekundäre Endosymbiose	2
1.1.3 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5
1.2 Das Endomembransystem	6
1.2.1 Theorien zur Entstehung des Endomembransystems	7
1.2.2 Die Vakuole – ein vielseitiges Kompartiment.....	8
1.3 Proteintransport in lysosomale Kompartimente und Speichervakuolen.....	10
1.3.1 Der sekretorische Weg	10
1.3.2 Targetingmotive	13
1.3.3 Adapterprotein (AP)-Komplexe.....	16
1.3.4 <i>Vacuolar Sorting Receptors</i> (VSRs).....	17
1.4 Zielsetzung.....	20
2 Ergebnisse	21
2.1 Identifizierung von Vakuolenproteinen	21
2.2 Charakterisierung der zentralen Vakuole von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	24
2.2.1 <i>Major Facilitator Superfamily</i> (MFS)	24
2.2.2 Kaliumkanäle und Ionentransporter	29
2.2.3 Sonstige Membranproteine	31
2.2.4 Peptidasen und Hydrolasen	36
2.3 Untersuchung des Proteintransportes von vakuolären Membranproteinen	40
2.3.1 Brefeldin A und Wortmannin	40
2.3.2 Identifizierung und Verifizierung putativer Tyrosin- und Dileucin Targetingmotiven	41
2.3.3 Interaktionsstudien mit CBS und μ -Untereinheiten der Adapter Protein Komplexe	52
2.4 <i>Vacuolar Sorting Receptors</i> (VSRs) in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	53
2.4.1 Untersuchung auf Sekretion von modifizierten <i>vacuolar sorting receptors</i>	53
2.5 Phylogenetische Analysen der vakuolären Proteine von <i>P. tricornutum</i>	57
3 Diskussion.....	63

3.1	Neue Proteine und ihre Funktionen.....	63
3.1.1	Proteine mit Sequenzähnlichkeit zu vakuolären Proteinen lokalisieren nicht zwingend in der Vakuole von <i>P. tricornutum</i>	63
3.1.2	Die Funktion der zentralen Vakuole von <i>P. tricornutum</i> anhand von lokalisierten Vakuolenproteinen.....	64
3.2	Der Proteintransport in die zentrale Vakuole von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	71
3.2.1	Ist <i>Phaeodactylum tricornutum</i> Wortmannin und Brefeldin A-resistent?	72
3.2.2	Tyrosin- und Dileucinmotive sind für den vakuolären Transport essentiell	73
3.2.3	Ist das Tyrosinmotiv „YGSI“ charakteristisch für den vakuolären Proteintransport in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ?.....	76
3.3	Ein verkürzter <i>vacuolar sorting receptor</i> sekretiert in den extrazellulären Raum	77
3.4	Die zentrale Vakuole von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> im evolutionären Kontext	78
4	Zusammenfassung.....	82
4.1	Abstract	83
5	Material und Methoden.....	84
5.1	Material	84
5.1.1	Organismen	84
5.1.2	Oligonukleotide und Vektoren	84
5.1.3	DNA-und Proteinmolekulagewichtsstandards	84
5.1.4	Chemikalien.....	84
5.1.5	Enzyme	85
5.1.6	Lösungen und Medien.....	85
5.1.7	Molekularbiologische Kits	85
5.1.8	Antikörper	85
5.1.9	Computer- und Internetanwendungen.....	85
5.1.10	Geräte.....	86
5.2	Methoden.....	87
5.2.1	Kultivierung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i>	87
5.2.2	Kultivierung und Lagerung von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	87
5.2.3	Isolation von genomischer DNA aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (modifiziert nach Doyle 1990)	88
5.2.4	Isolation von RNA aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	88
5.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	90
5.2.6	Agarosegelelektrophorese und DNA-Elution	92
5.2.7	DNA Elution aus Agarosegelen.....	93

5.2.8	Klonierung durch Restriktion und Ligation.....	93
5.2.9	Transformation von Bakterien	95
5.2.10	Plasmid-Isolation und Konzentrationsbestimmung (Mini-Präparation)	96
5.2.11	Midipräparation aus <i>Escherichia coli</i>	96
5.2.12	Konzentrationsbestimmung.....	96
5.2.13	DNA-Sequenzierung	97
5.2.14	Biolistische Transfektion der Diatomee <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (modifiziert nach Apt et al. 1996)	97
5.2.15	Gewinnung von Gesamtproteinextrakt.....	98
5.2.16	Ankonzentrieren des Überstands.....	99
5.2.17	Zellfraktionierung und Carbonatextraktion	99
5.2.18	Präzipitation von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA).....	99
5.2.19	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Amidoschwarz (modifiziert nach Schaffner und Weissmann 1973)	100
5.2.20	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (1970)	100
5.2.21	Färbung von SDS-Gelen mittels Instand Blue.....	101
5.2.22	Proteintransfer auf eine Trägermembran (Western Blot) (Towbin et al. 1979)	101
5.2.23	Immunologischer Nachweis von Proteinen	101
5.2.24	<i>In vivo</i> Lokalisationsstudien.....	102
5.2.25	Bioinformatische <i>in silico</i> Analysen	103
5.2.26	Phylogenetische Stammbaumanalysen	104
6	Literaturverzeichnis.....	105
7	Anhang	125
7.1	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>in silico</i> Ansätze zur Identifizierung vakuolärer Proteine in <i>P. tricornutum</i>	125
7.2	<i>In silico</i> Analysen der potentiellen Glykosidasen	133
7.3	Brefeldin A und Wortmannin-Behandlung von <i>P. tricornutum</i> -Kulturen	133
7.4	Self-Assembling GFP	137
7.5	<i>In silico</i> Analysen mittels <i>eukaryotic linear motif resource</i>	137
7.6	<i>In vivo</i> Lokalisationsstudien	139
7.6.1	NT _{VCT3} -PIP1-eGFP	139
7.6.2	μ-Untereinheiten der AP-Komplexe.....	139
7.7	Phylogenetische Analysen.....	140
7.8	Primer	146
7.9	Lösungen und Medien.....	154

7.9.1	Puffer und Lösungen	154
7.9.2	Nährmedien.....	157
7.9.3	Verwendete Antibiotika	158
Danksagung.....		159
Curriculum Vitae.....		160
Eidesstattliche Erklärung.....		161

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der primären Endosymbiose	2
Abbildung 2: Modell zur Entstehung der Organismen mit Plastiden rhodophytischen Ursprungs durch sekundäre Endosymbiose	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Entstehung des eukaryotischen Endomembransystems	8
Abbildung 4: Vakuolen-ähnliche Strukturen in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	10
Abbildung 5: Das Endomembransystem und der sekretorische Weg	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines VSRs	18
Abbildung 7: <i>In silico</i> Analysen von <i>P. tricornutum</i> Proteinen zur Identifizierung von neuen vakuolären Proteinen	22
Abbildung 8: Subzelluläre Lokalisation der identifizierten VCTs in <i>P. tricornutum</i>	28
Abbildung 9: Subzelluläre Lokalisation der identifizierten TPKs und CAT1	31
Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisation von VCT2	33
Abbildung 11: Subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine MATE1-eGFP und MATE2-eGFP	34
Abbildung 12: Schematische Darstellungen der Proteindomänen untersuchter YGSI-Proteine	35
Abbildung 13: <i>In vivo</i> Lokalisation von 47060, 44950 und 45961	36
Abbildung 14: Subzelluläre Lokalisation der identifizierten Glykosidasen mithilfe von eGFP-Fusionsproteinen	37
Abbildung 15: Immunogold-Markierung von (A) Peptidase1-eGFP und (B) β -GLYC2-eGFP detektiert mittels TEM	38
Abbildung 16: Western Blot nach Carbonatextraktion mit den lokalisierten Hydrolasen und Peptidasen	39
Abbildung 17: Subzelluläre Lokalisation von CBS Δ_{SP} -eGFP, ABC3 Δ_{SP} -eGFP und AbC3 Δ_{N1-121} -eGFP	42
Abbildung 18: Subzelluläre Lokalisation der putativen, mutierten Targetingmotive von ABC3-eGFP	44
Abbildung 19: Lokalisation der CBS-Deletions- und Aminosäureaustauschmutanten	45
Abbildung 20: Subzelluläre Lokalisation der PIP1 und PDZ2 Varianten sowie ihre Sequenzen	46
Abbildung 21: Proteinalignment von TIP1 aus <i>P. tricornutum</i> und dem Ortholog TIP5.1 aus <i>A. thaliana</i>	47
Abbildung 22: Subzelluläre Lokalisation modifizierter TIP1-Varianten	48
Abbildung 23: Alignments der Aminosäuresequenzen von VCT3 und TPK2 zu ihren jeweiligen Orthologen aus <i>A. thaliana</i>	49
Abbildung 24: <i>In vivo</i> Lokalisation von 45691_Y/A I/A-eGFP	50
Abbildung 25: <i>In vivo</i> Lokalisation der Aminosäureaustauschmutanten von VCT3	51
Abbildung 26: Subzelluläre Lokalisation der Aminosäureaustauschmutanten von TPK2	52
Abbildung 27: Subzelluläre Lokalisation von ptVSR1, ptVSR2 und ptVSR3 sowie ihrer Varianten	54
Abbildung 28: Western Blot mit anschließender Immunodetektion nach der Carbonatextraktion der Fusionsproteine VSR1 Δ TMD-eGFP, VSR2 Δ TMD-eGFP und VSR3 Δ TMD-eGFP	55
Abbildung 29: SDS-Gel nach Behandlung mit Instant Blue	56
Abbildung 30: Phylogenetische Analyse von CBS	58
Abbildung 31: Phylogenetische Analyse von VTC2	58
Abbildung 32: Phylogenetische Analyse von CAT1	59

Abbildung 33: Phylogenetische Analyse von VCT3	60
Abbildung 34: Phylogenetische Analyse von MATE1	61
Abbildung 35: Phylogenetische Analyse von β -GLYC1	62
Abbildung 36: Phylogenetische Analyse von β -GLYC2	62
Abbildung 37: Schematische Darstellung der lokalisierten Proteine mit ihrer möglichen Funktion in der zentralen Vakuole von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	65
Abbildung 38: Alignment der Primärsequenzen von TPK2 aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i> und AtTPK1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
Abbildung 39: Alignment der Primärsequenzen von CAT1 aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i> und MTP1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
Abbildung 40: Ausschnitt der Primärsequenzen der putativen <i>guanidine-nucleotide exchange factors</i> (GEFs) aus <i>P. tricornutum</i>	73
Abbildung 41: 1 kb Ladder von GeneDirex	92
Abbildung 42: Schematische Darstellung des Gibson Assemblys	94
Abbildung 43: Subzelluläre Lokalisation von ABC3-eGFP exprimierenden <i>P. tricornutum</i> -Zellen nach Brefeldin A-Behandlung	133
Abbildung 44: Subzelluläre Lokalisation von CBS-eGFP exprimierenden <i>P. tricornutum</i> -Zellen nach Brefeldin A-Behandlung	134
Abbildung 45: Subzelluläre Lokalisation von TIP1-eGFP exprimierenden <i>P. tricornutum</i> -Zellen nach Brefeldin A-Behandlung	134
Abbildung 46: Subzelluläre Lokalisation von Pip1-eGFP exprimierenden <i>P. tricornutum</i> -Zellen nach Brefeldin A-Behandlung	135
Abbildung 47: Subzelluläre Lokalisation von VCT3-eGFP exprimierenden <i>P. tricornutum</i> -Zellen nach Wortmannin-Behandlung	136
Abbildung 48: Subzelluläre Lokalisation von Self assembling GFP-Fusionskonstrukten	137
Abbildung 49: Subzelluläre Lokalisation von VCT3 _{NT} -PIP1-eGFP	139
Abbildung 50: Subzelluläre Lokalisationen der μ -Untereinheiten der AP-Komplexe in <i>P. tricornutum</i>	139
Abbildung 51: Phylogenetische Analyse von 45961	140
Abbildung 52: Phylogenetische Analyse von VCT6	141
Abbildung 53: Phylogenetische Analyse von TPK2	142
Abbildung 54: Phylogenetische Analyse von TIP1	143
Abbildung 55: Phylogenetische Analyse von MATE2	143
Abbildung 56: Phylogenetische Analyse von ABC3	144
Abbildung 57: Phylogenetische Analyse von Peptidase1	145

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Adapterprotein-Komplexe.....	16
Tabelle 2: Zusammenfassung des Screenings für putative Vakuolenproteine basierend auf dem möglichen Tyrosinmotiv „YGSF“.....	23
Tabelle 3: Übersicht der bearbeiteten Genmodelle.....	24
Tabelle 4: Identifizierte Zuckertransporter der MFS-Superfamilie.....	26
Tabelle 5: Identifizierte putative Kaliumkanäle und Ionentransporter.....	30
Tabelle 6: Identifizierte MATE-Proteine aus <i>P. tricornutum</i>	32
Tabelle 7: <i>In silico</i> untersuchte Glykosidasen aus <i>P. tricornutum</i>	37
Tabelle 8: Lokalisierte Vakuolenmembranproteine in <i>P. tricornutum</i>	40
Tabelle 9: Identifizierte Untereinheiten der Adapter Protein Komplexe 1-4.....	53
Tabelle 10: Identifizierte Proteine des aufkonzentrierten Medoiums mittels HDX-Massenspektroskopie.....	57
Tabelle 11: Übersicht der untersuchten Tyrosin- und Dileucinmotiven der in vivo lokalisierten Proteine aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	74
Tabelle 12: Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen der phylogenetisch untersuchten Proteinsequenzen von <i>P. tricornutum</i>	80
Tabelle 13: Verwendete Organismen mit Genotyp und Herkunft.....	84
Tabelle 14: Verwendete Vektoren mit ihren <i>Accession numbers</i>	84
Tabelle 15: Verwendete molekularbiologische Kits.....	85
Tabelle 16: Verwendete Antikörper.....	85
Tabelle 17: Verwendete Geräte.....	86
Tabelle 18: Reaktionsansatz für DNase I-Behandlung.....	89
Tabelle 19: Reaktionsansatz für cDNA-Synthese.....	89
Tabelle 20: PCR-Programm für cDNA-Synthese.....	90
Tabelle 21: PCR-Ansatz für die Taq-Polymerase.....	91
Tabelle 22: PCR-Programm für die Taq-Polymerase.....	91
Tabelle 23: PCR-Ansatz für die Q5-Polymerase.....	91
Tabelle 24: PCR-Programm für die Q5-Polymerase.....	92
Tabelle 25: Restriktionsansatz.....	93
Tabelle 26: Ligationsansatz für die T4-Ligase.....	94
Tabelle 27: Gibson Reaktionsansatz.....	95
Tabelle 28: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.....	101
Tabelle 29: Zusammenfassung des gerichteten <i>in silico</i> Ansatzes zu Identifizierung von vakuolären Proteinen in <i>P. tricornutum</i>	125
Tabelle 30: Zusammenfassung der <i>in silico</i> Analysen hinsichtlich der Transmembrandomänen mittels verschiedener Vorhersagetoools.....	133
Tabelle 31: Zusammenfassung der potentiellen Targetingmotive von vakuolären Proteinen.....	137
Tabelle 32: Verwendete Primer für putative vakuoläre Proteine.....	146
Tabelle 33: Verwendete Primer für zur Modifizierung von vakuolären Proteinen.....	150
Tabelle 34: Verwendete Primer für die Generierung von Split-GFP Konstrukten.....	152
Tabelle 35: Verwendete Sequenzierprimer.....	153

Abkürzungsverzeichnis

α	anti	min	Minute
μL	Mikroliter	mL	Milliliter
μg	Mikrogramm	mm	Millimeter
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	mM	Millimolar
COP	<i>coat protein</i>	MVB	<i>multi vesicular body</i>
Abb.	Abbildung	nm	Nanometer
ABC	<i>ATP binding cassette</i>	NR	Nitratreduktase
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat	NH_4	Ammonium
AS	Aminosäure(n)	NH_3	Nitrat
ATP	Adenintriphosphat	OD	Optische Dichte
BFA	Brefeldin A	OMV	<i>outer membrane vesicle</i>
Bp	Base pairs	PAC	<i>precursor accumulating compartment</i>
BLAST	Basic Local Alignment search tool	PAF	Plastidenautofluoreszenz
CBS	<i>cystathionine beta synthase</i>	PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
CCV	<i>clathrin coated vesicle</i>	PBS	Phosphate buffered saline
cDNA	<i>complementary DNA</i>	psi	<i>pound-force per square inch</i>
CDS	<i>conserved domain search</i>	PSV	<i>protein storage vacuole</i>
cER	<i>chloroplast ER</i>	RNA	Ribonukleinsäure
d.h.	das heißt	RT	Raumtemperatur
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser	s	Sekunde
DMSO	Dimethylsuloxid	SP	Signalpeptid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Tab	Tabelle
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	TBS	<i>tris buffered saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TCA	Trichloressigsäure
EE	<i>early endosome</i>	TEMED	Tetramethylethylendiamin
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
et al	et alii	TIP	<i>tonoplast intrinsic protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum	TL	<i>transmitted light</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>	TPK	<i>two pore potassium channel</i>
GDP	Guanosindiphosphat	U	Unit
GEF	<i>guanosine exchange factor</i>	ÜN	Über Nacht
GTP	Guanosintriphosphat	VCT	<i>vacuolar carbohydrate transporter</i>
h	<i>hours, Stunden</i>	Vol	Volumen
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>	VSD	<i>vacuolar sorting determinant</i>
kDa	Kilodalton	VSR	<i>vacuolar sorting receptor</i>
KLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop	VSS	<i>vacuolar sorting signal</i>
M	Molar	VTC	<i>vacuolar transport chaperon</i>
mA	Milliampere	v/v	<i>volume per volume</i>
MATE	<i>multi drug and toxic extrusion</i>	WT	Wildtyp
mg	Milligramm	w/v	<i>weight per volume</i>

1 Einleitung

1.1 Endosymbiontentheorie

Die oxygene Photosynthese, die biochemische Synthese von Sauerstoff und organischen, energiereichen Kohlenstoffverbindungen aus Wasser und Kohlenstoffdioxid unter Verwendung von Lichtenergie, ist ein wichtiges bioenergetisches Ereignis des komplexen Lebens. Der stetige Anstieg von Sauerstoff in der Erdatmosphäre wird auf ca. 2,4-2,1 Millionen Jahre datiert und auf die Entwicklung der oxygenen Photosynthese in den Vorfahren heutiger Cyanobakterien zurück geführt (Lyons et al. 2014; Hamilton et al. 2016). Der Prozess der Photosynthese beschränkte sich nicht nur auf prokaryotische Organismen, auch einige Eukaryoten sind befähigt Photosynthese zu betreiben. Allerdings ist die oxygene Photosynthese in Eukaryoten keine eigenständige Erfindung, sondern eine Akquirierung durch die Aufnahme eines Photosynthese-fähigen, Cyanobakterien-ähnlichen Prokaryoten, was in photoautotrophen, eukaryotischen Zellen zur „Entwicklung“ der Plastide führte. 1905 führte Konstantin Mereschkowsky bereits den Vergleich zwischen Cyanobakterien und Plastiden an, erst 65 Jahre später wurde von Lynn Margulis die Theorie der Endosymbiose formuliert, in der postuliert wird, dass Plastiden und Mitochondrien bakteriellen Ursprungs sind (Mereschkowsky 1905; Margulis 1970).

1.1.1 Die Entstehung photosynthetisch aktiver Eukaryoten – die Primäre Endosymbiose

Die Internalisierung eines ancestralen phototrophen Cyanobakteriums von einem eukaryotischen Wirt mit anschließender Etablierung des Cyanobakteriums als semiautonomes Organell wird als primäre Endosymbiose bezeichnet (Douglas und Turner 1991). Bei diesem phagotrophischen Ereignis bildete sich wahrscheinlich zuerst eine chimärische Zelle, in der der Symbiont durch drei Membranen, seinen zwei Hüllmembranen und der Membran der phagocytotischen Vakuole des Wirts, vom Wirtscytosol separiert wurde (Maier et al. 2000). Die Etablierung des Endosymbionten als semi-autonomes Organell ging mit einer drastischen Reduzierung des Endosymbionten selbst einher, bei der redundantes Genmaterial und eine der drei Hüllmembranen, vermutlich die Membran der phagocytotischen Vakuole, verloren ging (zusammengefasst in Stoebe und Maier 2002; Gould et al. 2008). Des Weiteren wurde ein Großteil essentieller Gene des Endosymbionten in das Genom des Wirts integriert (Gould et al. 2008; Maier et al. 2015). Der Transfer Symbiont-spezifischer Gene in den Nukleus des Wirts wird als endosymbiontischer Gentransfer (EGT) bezeichnet (Timmis et al. 2004). Sowohl die Reorganisation der Gene als auch die Reduktion des Symbionten stellten enorme Umstrukturierungen dar, die beispielsweise Translokationsmechanismen für die nun Nukleus-codierten Symbiontenproteine und spezifische Zielsteuerungssequenzen erforderlich machten. Aus der primären Endosymbiose entwickelten sich

die rezenten Linien der Glaucophyta, Rhodophyta und Chlorophyta, aus der die Gruppe der Embryophyta hervor ging (Abb. 1) (Martin und Herrmann 1998). Diese drei Linien können als Archaeplastida zusammen gefasst werden (Adl et al. 2005), die eine von zwei Hüllmembranen umgebene Plastide besitzen. Durch phylogenetische Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Entstehung dieser drei rezenten Linien, d. h. der primären Endosymbiose, um ein monophyletisches Ereignis handelte (Martin et al. 2002; Chan et al. 2011; Price et al. 2012). Trotz der postulierten Monophylie dieser Gruppen, konnte ein zweites Endosymbioseereignis ermittelt werden, bei dem ein photosynthetisch aktives Organell bakteriellen Ursprungs entstand. *Paulinella chromatophora* ist ein Vertreter dieser weiteren primären Endosymbiose, dessen Chromatophore eine ähnliche Funktion wie Plastiden besitzen, phylogenetisch jedoch einen anderen Ursprung aufweisen (Marin et al. 2005).

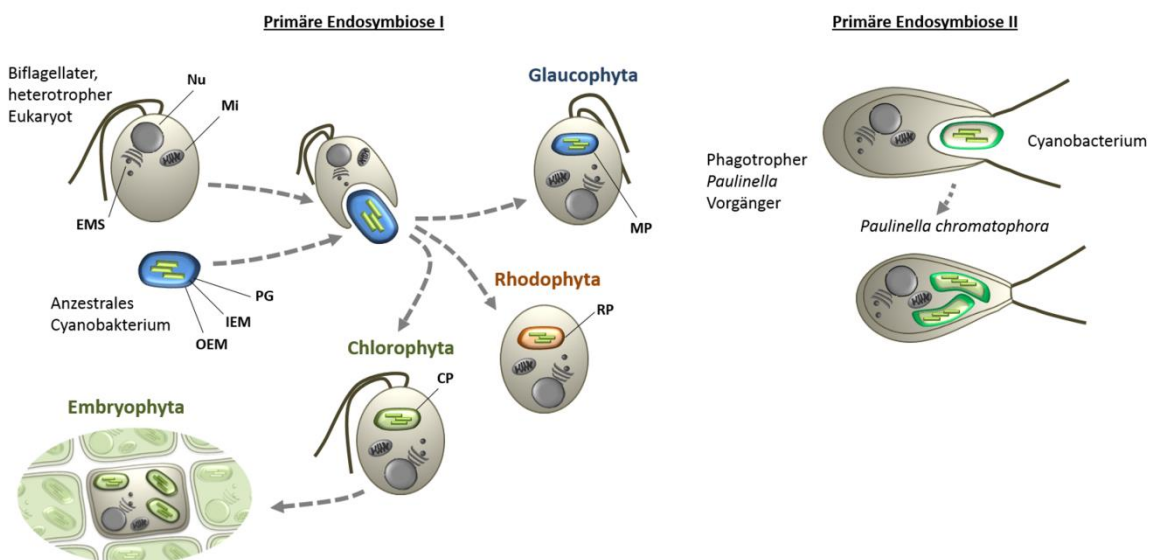


Abbildung 1: Schematische Darstellung der primären Endosymbiose. Ein anzestrales Cyanobakterium-ähnlicher Vorgänger wird von einem heterotrophen Eukaryoten internalisiert und sukzessiv als primäre Plastide etabliert. Aus diesem monophyletischen Ereignis entstanden die rezenten Linien der Glaucophyta, Rhodophyta und Chlorophyta, aus der sich die Embryophyta entwickelten. *Paulinella chromatophora* ist ein Vertreter einer weiteren primären Endosymbiose, der phylogenetische Ursprung des aufgenommenen Cyanobakterium-Vorgängers unterscheidet sich von dem der Glaucophyta, Rhodophyta und Chlorophyta. Nu= Nukleus; MI= Mitochondrium; EMS= Endomembransystem; PG= Peptidoglycan; IEM= innere Hüllmembran (*inner envelope*); OEM; äußere Hüllmembran (*outer envelope*); MP= Muroplast; RP=Rhodoplast; CP= Chloroplast (modifiziert nach Moog, 2012 und Gentil et al. 2017).

1.1.2 Die Entstehung der Chromalveolaten – die sekundäre Endosymbiose

Neben den Archaeplastida, die durch primäre Endosymbiose eine Plastide mit zwei Hüllmembranen besitzen, gibt es eine Vielfalt an Protisten, die als charakteristisches Merkmal eine Plastide mit drei bis vier Hüllmembranen aufweisen (Cavalier-Smith 2000). Aufgrund ihres Aufbaus werden solche Plastiden als komplexe Plastiden bezeichnet. Sie sind durch sekundäre Endosymbiose, d.h. durch die Internalisierung eines aus der primären entstandenen Organismus in eine eukaryotische Wirtszelle mit anschließender sukzessiver Reduktion, entstanden (Stoebe und Maier 2002; Maier

et al. 2015). Ein Beleg für solch ein Ereignis liefern Chlorarachniophyten und Cryptophyten, bei denen ein reduzierter Zellkern (Nukleomorph) des Endosymbionten zwischen der zweiten und dritten Hüllmembran der komplexen Plastide erhalten blieb (Greenwood et al. 1977; Hibberd und Norris 1984). Bei einer Symbiose höherer Ordnung werden neben der primären Plastide auch Informationen des primären Wirts an die sekundäre Wirtszelle weiter gegeben. Wie auch bei der primären Endosymbiose fand eine drastische, genetische Reorganisation statt, bei der redundante Symbiontengene verloren gingen und essentielle Gene in den Nukleus des Wirts transferiert wurden (zusammengefasst in Kleine et al. 2009). Dabei wurden nicht nur essentielle Gene aus dem Plastidengenom, sondern in erster Linie Gene aus dem Nukleus-kodierten Genom des eukaryotischen Endosymbionten in das Wirtsgenom transferiert. Das Ereignis der sekundären Symbiose hat im Laufe der Entwicklung nicht nur einmal stattgefunden, sondern unabhängig voneinander mindestens dreimal (Keeling 2009). So wurde zweimal unabhängig voneinander eine Chlorophyte von einer eukaryotischen Wirtszelle internalisiert, wodurch die Chlorarachniophyta und die Euglenophyta entstanden sind. Diese können den Excavata bzw. den Rhizaria zu geordnet werden (Rogers et al. 2007; Jackson et al. 2018). Die Aufnahme einer Rhodophyte durch eine eukaryotische Wirtszelle hat mindestens einmal stattgefunden; ein Ereignis aus dem die Alveolata (Dinophyta und Apicomplexa), und Chromista (Cryptophyta, Haptophyta und Heterokontophyta) hervorgegangen sind (Abb. 2) (zusammengefasst in Gould et al. 2008). Die komplexen Plastiden der Apicomplexa, Apicoplasten genannt, haben die Fähigkeit verloren Photosynthese zu betreiben, dennoch blieb das Organell für essentielle Stoffwechselwege wie die Fettsäure-, Isoprenoid- und Häm-Synthese erhalten (Woehle et al. 2011). Vertreter, die keine komplexe Plastide besitzen, sind unter anderem in der Linie der Cryptophyta, wie beispielsweise Goniomonas, zu finden (Cavalier-Smith und Chao 2006). Genomanalysen deuteten auf Gene cyanobakteriellen Ursprungs hin, ob diese jedoch über EGT oder lateralen Gentransfer (LGT) integriert worden sind, ist nicht geklärt (Archibald 2009).

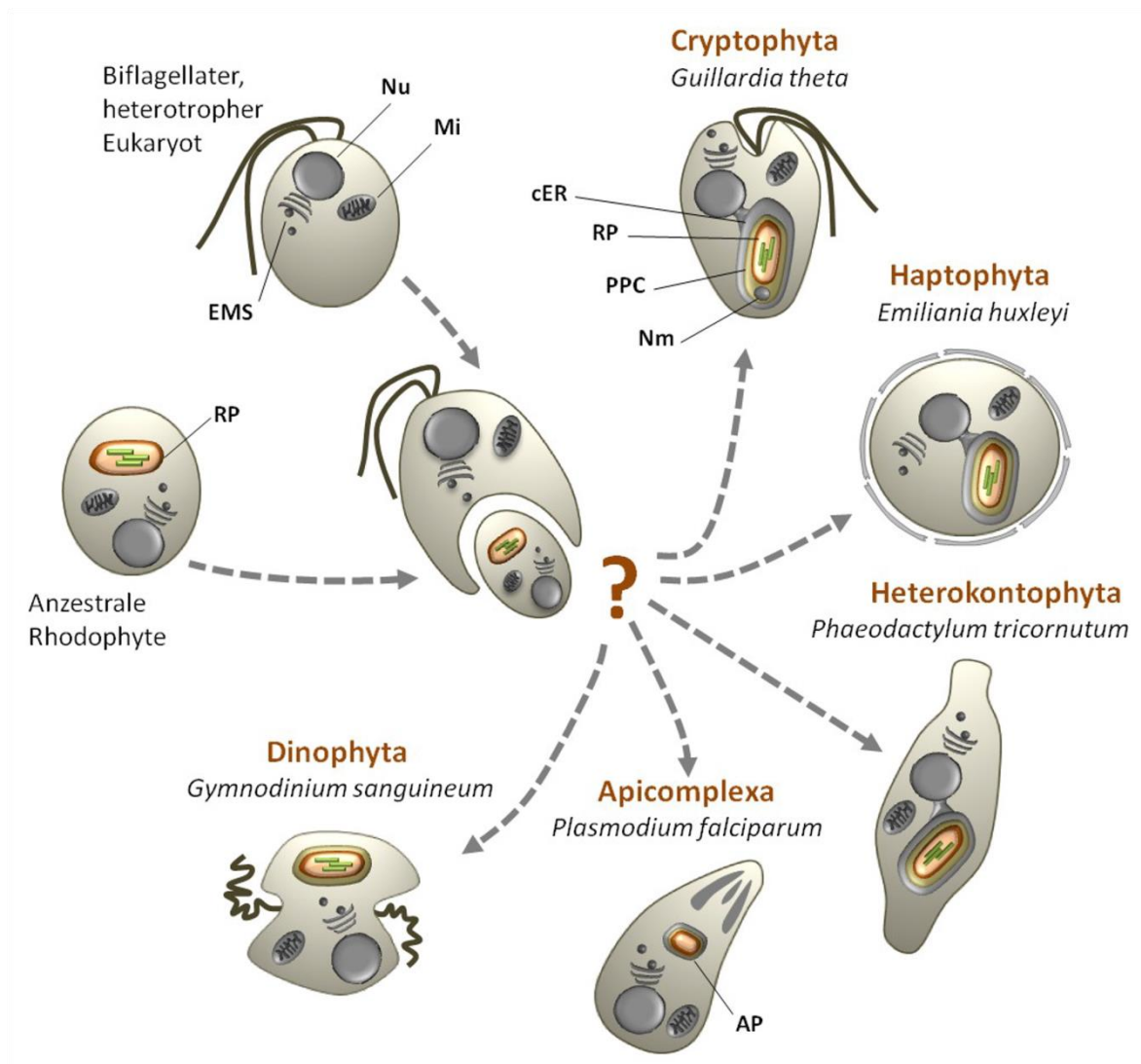


Abbildung 2: Modell zur Entstehung der Organismen mit Plastiden rhodophytischen Ursprungs durch sekundäre Endosymbiose. Durch die Aufnahme einer Rhodophyte durch eine eukaryotische Zelle mit anschließender Reduktion des Endosymbionten entstanden die Linien der Cryptophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, Apicomplexa und Dinophyta. Das Ereignis der sekundären Endosymbiose mit einer Rhodophyte fand nach der Chromalveolatenhypothese (Cavalier-Smith 1999) mindestens einmal statt. Nu=Nukleus; Mi=Mitochondrium; EMS= Endomembransystem; cER= *chloroplast endoplasmic reticulum*; RP= Rhodoplast; PPC= periplastidäres Kompartiment; Nm= Nukleomorph; AP= Apicoplast (Abbildung aus Moog, 2012)

Cavalier-Smith fasste die Gruppe der Alveolaten und der Chromista zu dem Superphylum „Chromalveolata“ zusammen und stellte die Chromalveolatenhypothese auf, in der er postulierte, dass die Entstehung der Organismen mit komplexen Plastiden rhodophytischen Ursprungs monophyletisch war (Cavalier-Smith 1999). Die Hypothese wurde zunächst mit dergleichen Zusammensetzung der Pigmente der Plastiden und der Ähnlichkeit der Plastidenmorphologie begründet. Sie setzt alldem auch voraus, dass eine Endosymbiose zwischen zwei Eukaryoten eine solche Komplexität bezüglich der Etablierung des eukaryoten Endosymbionten als Organell und den dazugehörigen Regulationsmechanismen aufweist, wodurch es unwahrscheinlich wäre, dass dieses Ereignis mehrmals stattgefunden hat (Cavalier-Smith 1999). Es gibt viele Publikationen, die die Chromalveolatenhypothese bzw. den monophyletischen Ursprung der komplexen Plastide,

unterstützen (Yoon et al. 2002; Harper und Keeling 2003; Harper et al. 2005; Hackett et al. 2007; Patron und Waller 2007). Dennoch ist die Monophylie der Chromalveolaten umstritten und neue Studien lassen die Entstehung dieses Superphylums wesentlich komplexer erscheinen. Phylogenetische Analysen von Burki und Kollegen ließen vermuten, dass Mitglieder der Chromalveolaten aus unterschiedlichen Wirtslinien hervor gingen (Burki et al. 2007; Burki et al. 2012b). Weitere Analysen deuten auf eine initiale Endsymbiose hin, auf die tertiäre Endosymbiosen folgten (Sanchez-Puerta und Delwiche 2008; Bodył et al. 2009; Baurain et al. 2010; Petersen et al. 2014). Demnach lassen sich Cryptophyten und Haptophyten auf einen gemeinsamen Ursprung zurückführen, während Alveolata und Heterokontophyta durch tertiäre Symbiose mit einem Endosymbionten aus der Linie der Cryptophyta oder Haptophyta entstanden sind (Sanchez-Puerta und Delwiche 2008; Archibald 2009). Eine gemeinsame Wirtslinie der Cryptophyten und Haptophyten wurde von Burki und Kollegen 2012 jedoch angezweifelt (Burki et al. 2012b). Phylogenetische Analysen derselben Publikation deuten darauf hin, dass die Haptophyten eine Schwestergruppe der SAR-Klade, bestehend aus den Heterokontophyta (Stramenopiles), den Alveolata und Rhizaria, bilden (Burki et al. 2007; Burki et al. 2012b).

Die Komplexität der Rekonstruktion der evolutionären Herkunft von Organismen rhodophytischen Ursprungs nimmt durch phylogenetische Analysen zu, bei denen ein signifikanter Anteil von Genen chlorophytischen Ursprungs im Kerngenom von Diatomeen (Heterokontophyta) und einem photosynthetisch aktiven Alveolaten identifiziert werden konnte (Moustafa et al. 2009; Woehle et al. 2011). Dieser signifikante Anteil „grüner Gene“ kann unterschiedlich interpretiert werden. Zum einen könnten diese ein polygenetisches Artefakt darstellen, das durch die Limitierung an sequenzierten Rhodophytengenomen zu erklären ist (Moustafa et al. 2009; Woehle et al. 2011; Burki et al. 2012a). Zum anderen könnten Gene chlorophytischen Ursprungs durch lateralen Gentransfer oder auf eine kryptische Endosymbiose mit einer Chlorophyte zurück zu führen sein, bei der die dabei entstandene Plastide vor der Akquirierung der Rhodophyte verloren ging (Dorrell und Smith 2011; Dorrell et al. 2017). Auch wenn die Herkunft der komplexen Plastide mit rhodophytischen Ursprung umstritten ist, deuten viele phylogenetische Analysen auf ein polyphyletisches Ereignis hin.

1.1.3 *Phaeodactylum tricornutum*

Ein Vertreter der Heterokontophyta ist die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*, die eine Komplexe Plastide mit vier Hüllmembranen rhodophytischen Ursprungs besitzt (s. Kap. 1.1.2). Diatomeen sind ökologisch höchst relevante Mikroalgen, die global in marinen und limnischen Gewässern vorkommen und in marinen Gewässern rund 20 % der Photosynthese auf der Welt ausmachen (Armbrust 2009). Aufgrund ihrer Präsenz spielen sie eine bedeutende Rolle bei der

Photosyntheseleistung (Granum et al. 2005). *P. tricornutum* ist in der Wissenschaft ein prominenter etablierter Organismus für die „blaue“ Biotechnologie als auch für molekularbiologische Studien als Vertreter der Heterokontophyta. Das Genom von *P. tricornutum* weist eine Größe von 27,4 Mbp auf und ist vollständig sequenziert (Bowler et al. 2008). Zudem konnten verschiedene molekularbiologische Methoden in diesem Organismus etabliert werden, so dass dieser effizient genetisch manipuliert (RNAi, TALEN oder CRISPR/Cas) oder Fremd-DNA eingebracht (Biolistische Transfektion, Elektroporation, Konjugation) werden kann (Apt et al. 1996; Riso et al. 2009; Zaslavskaja et al. 2000; Daboussi et al. 2014; Nymark et al. 2016; Karas et al. 2015). Aufgrund dieser vorhandenen molekularbiologischen Methoden ist *P. tricornutum* ebenfalls ein geeigneter Organismus für Lokalisationsstudien, die es ermöglichen mittels GFP (*green fluorescent protein*)-Fusionsproteine die verschiedenen Kompartimente der Zelle fluoreszenzmikroskopisch zu unterscheiden (Moog et al. 2015; Liu et al. 2016).

1.2 Das Endomembransystem

Ein wichtiges strukturelles Hauptmerkmal, das eine prokaryotische von einer eukaryotischen Zelle unterscheidet ist, neben dem Nukleus, das Endomembransystem (EMS). Als Endomembransystem werden als kanonische Kompartimente das Endoplasmatische Retikulum (ER) und der perinukleare Raum, der sich mit dem Lumen des ERs in einem Kontinuum befindet, die Kernhülle, der Golgi-Apparat, das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) bzw. das Endosom sowie die Plasmamembran als auch die Vakuole bzw. das Lysosom und Peroxisomen zusammen gefasst. Im Taxon der Chromista (s. Kap. 1.1.2) bildet die äußere Membran der komplexen Plastide ein Kontinuum mit dem ER, dieses wird auch als *chloroplast endoplasmic reticulum* (cER) bezeichnet und gehört somit ebenfalls zum EMS (Gibbs 1979; Bolte et al. 2009). Weitere Studien zeigen, dass komplexe Plastiden der Alveolata und Euglenophyta über ein unabhängiges Kompartiment in Verbindung mit dem EMS stehen (Nassoury et al. 2003; Slavikova et al. 2005; Tonkin et al. 2008). Das interne Membransystem steht durch das Abschnüren und der Fusion von Vesikeln mit den unterschiedlichen Membranen in einem kontinuierlichen Membranfluss, womit der Molekültransport garantiert wird (Dacks et al. 2008). Die Membranen des EMS trennen biochemische Prozesse räumlich voneinander, wodurch jedes Kompartiment spezifische Aufgaben während des Molekül- bzw. Proteintransportes übernimmt (Field und Dacks 2009). So werden am (rauen) ER Proteine synthetisiert, gefaltet und können kotranslational glykosyliert werden, wodurch unter anderem eine korrekte Faltung der Proteine gewährleistet wird (zusammengefasst in Satiat-Jeunemaitre und Hawes 1993; Galili et al. 1998). Des Weiteren werden im ER Lipide synthetisiert und in einigen Organismen diese auch im ER gespeichert (zusammengefasst in Hawes et al. 1999). Der Golgi-Apparat dient in erster Linie zur Modifizierung von Glykoproteinen und ist am Proteintransport einschließlich des *protein sorting*,

als auch der Oligo- und Polysaccharidsynthese beteiligt (Bolte et al. 2004; Foresti und Denecke 2008). Das TGN in pflanzlichen Zellen ist das Analogon zum frühen Endosom (*early endosome*, EE) in Säugerzellen und übernimmt im weiteren Verlauf als spätes Endosom eine essentielle Rolle im vakuolären Proteintransport sowie bei der Kontrolle der Sekretion und der Endocytose (Tanchak et al. 1988; Lam et al. 2007).

1.2.1 Theorien zur Entstehung des Endomembransystems

Die Kompartimente des EMS sind in Eukaryoten ubiquitär vorhanden, ebenso wie deren spezifische Schlüsselproteine, beispielsweise *Ras related in brain* (Rab)-Proteine, *soluble N-ethylmaleimidesensitive-factor attachment receptor* (SNARE) und *coat protein* (COP)-Komplexe (Dacks et al. 2008). Infolge dessen sollten sowohl die Kompartimente als auch die Schlüsselproteine im gemeinsamen eukaryotischen Vorfahren vorhanden gewesen sein, wodurch der Ursprung des EMS in Verbindung mit dem Ursprung eukaryotischer Organismen gebracht wird (Gould et al. 2016). Zur Entstehung des EMS gibt es mehrere Theorien, die entweder einen autogenen, (nicht-symbiontisch) oder symbiontischen Ursprungs postulieren. Eine Theorie zur Entstehung des EMS basiert auf dem autogenen Ursprung eines neuen Membransystems einschließlich der Kernhülle in einer archaealen Wirtszelle. Hierbei soll die Entstehung des Membransystems vor der Akquirierung des Mitochondriums datiert sein (Cavalier-Smith 1989). Cavalier-Smith formulierte die Hypothese, bei der die Kernhüll- und die ER-Membran durch Invagination der Plasmamembran eines Prokaryoten entstanden sei (Cavalier-Smith 1987, 1988). Ein Beispiel für eine symbiontische Hypothese formulierten Lake und Rivera, die annahmen, dass eine eukaryotische Zelle das Resultat einer Endosymbiose zwischen einem Bakterium (Wirt) und einem Archaeon (Symbiont) ist und so der Zellkern entstanden sei (Lake und Rivera 1994). Eine fortführende Hypothese von Lake und Rivera beschreibt die Entstehung des EMS aus einem methanogenen Euryarchaeon, das durch Anhäufung mehrerer δ -Proteobakterien „umzingelt“ wurde, und durch autogene Invagination der Plasmamembranen als Zellkern etabliert worden ist (Moreira und López-García 1998). All diese Hypothesen haben den Prozess der Invagination und das Abschnüren der Plasmamembran gemein (Vitale und Denecke 1999).

Eines der aktuellsten Modelle zur Entwicklung des Endomembransystems berücksichtigt sogenannte *outer membrane vesicles* (OMV), die von Bakterien und Archaeen generiert werden können und diese in ihre Umgebung sekretieren (Gould et al. 2016). Es wird postuliert, dass nach einer Endosymbiose zwischen einem Archaeon und eines α -Proteobakteriums die Sekretion der OMVs nicht eingestellt wurde, wodurch die ersten Vesikel proteobakteriellen Ursprungs innerhalb des archaealen Cytosols vorhanden waren (Abb. 3). Die cytoplasmatischen OMVs stellen in diesem Modell ein alternatives Ziel für archaeale Maschinerien des Proteintransportes oder der

Proteinmodifikation dar, wodurch ein primitives ER entstanden sein könnte. Durch das Vorhandensein des primitiven ERs einschließlich der zellulären OMVs wird die Entstehung weiterer Kompartimente des EMS wie beispielsweise eine Vakuole gewährleistet. Simultan wurden archaeale Isoprene mit ihren Etherverbindungen gegen Esther-vernetzte Fettsäuren des Proteobakteriums ausgetauscht. Die Bildung des Genoms geht hier auf chimäre Chromosomen zurück, die aus einer Endosymbiose resultierten (Martin und Koonin 2006). Hiernach könnten eubakterielle Gene durch EGT in das Wirtsgenom integriert worden sein. Die Inversion der Introns der Klasse II, d.h. selbstspleißende Introns, und deren Mutationsverfall in spleißosomale Introns resultierte in der Formierung des Zellkerns, wodurch eine räumliche Trennung der Transkription und des Spleißens (Nukleus) und der Translation (Cytosol) stattgefunden hat und somit ausschließlich eine Translation der muren mRNA gewährleistet wurde (Martin und Koonin 2006; Gould et al. 2016).

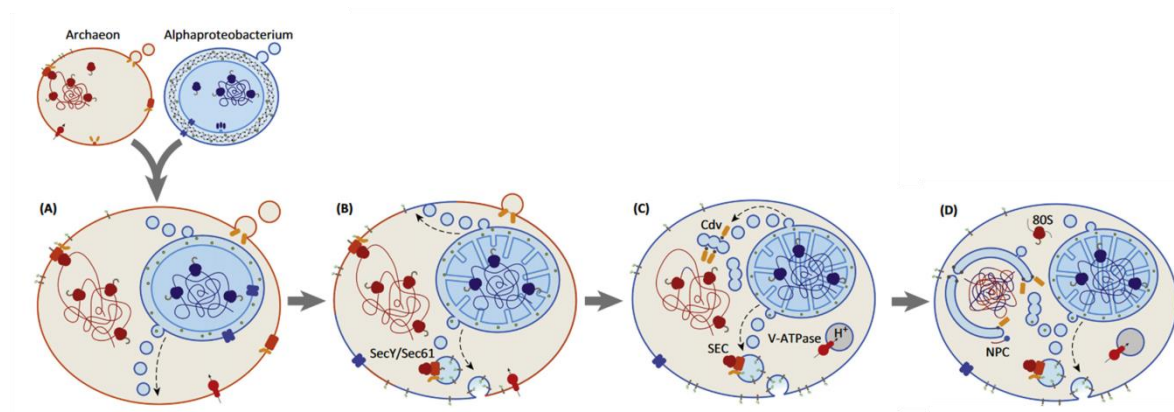


Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Entstehung des eukaryotischen Endomembransystems. (A) Nach der Endosymbiose sekretiert der Symbiont weiterhin *outer membrane vesicles* (OMV) in das Wirtscytosol, wodurch der erste Vesikelfluss initiiert wird. (B) Die cytoplasmatischen OMVs bieten ein alternatives *Targeting* für die archaischen Proteintransport- und Proteinmodifizierungs-Maschinen und bilden somit ein primitives ER. Der Vesikelfluss zur Plasmamembran wird stabilisiert und gleichzeitig die Bausteine der archaischen Zellmembran gegen die des α -Proteobakteriums ausgetauscht. (C) Die Inversion der Introns der Klasse II zwingt die Zelle zur räumlichen Trennung der Transkriptions- und Translationsmechanismen. Die Präsenz des primitiven ER erlaubt es, weitere Kompartimente wie die Vakuole entstehen zu lassen. (D) Ein Zellkern wurde gebildet, wodurch Ribosomen aus dem Nukleus ausgeschlossen wurden (modifiziert nach Gould et al. 2016)

1.2.2 Die Vakuole – ein vielseitiges Kompartiment

Vakuolen sind Kompartimente, die von einer einfachen Membran umgeben sind und je nach Organismus verschiedenste Rollen übernehmen können. Parasitäre Protozoen nutzen parasitophore Vakuolen, um in ihnen zu überleben und sich im Wirt zu vermehren (Lingelbach und Joiner 1998). Am Beispiel von Leishmanien ist die parasitophore Vakuole eine Chimära aus Lysosom und Phagosom des Wirts, dessen Eigenschaften vergleichbar mit denen der edocytotischen Kompartimente sind (Antoine et al. 1998). Ein weiteres Beispiel für Protozoen, die sich intrazellulär in einer parasitophoren Vakuole vermehren, sind der Toxoplasma- und der humane Malaria-Erreger (Lingelbach und Joiner 1998). Letztere besitzt ein auf Proteindegradation spezialisiertes,

acides Organell, dass als *food*-Vakuole bekannt ist (Chugh et al. 2013). Im Gegensatz dazu können symbiontische Vakuolen auftreten, die den Symbionten im Cytosol des Wirts umschließen (Kostygov et al. 2016). In Süßwasser Protozoen dient die sogenannte kontraktile Vakuole als osmoregulatorisches Organell, das Wasser aufnimmt und dieses periodisch wieder abgibt (zusammengefasst in Allen und Naitoh 2002; Buchmann und Becker 2009). Zur Aufnahme des Wassers dient indirekt ein Protonengradient, der durch V-ATPasen gebildet wird (Heuser et al. 1993). Eine lytische Funktion in Säugerzellen übernimmt das Lysosom, das Analogon zur pflanzlichen Vakuole, in deren Lumen Makromoleküle degradiert werden und als Reservoir für Aminosäuren und Ionen dient (zusammengefasst in Ballabio 2016). In Pflanzen werden zwei Arten von Vakuolen aufgrund ihrer Größe und metabolischen Fähigkeiten unterschieden (Frigerio et al. 2008). Die zentrale oder lytische Vakuole nimmt bis zu 90 % der pflanzlichen Zelle ein und besitzt eine hohe Acidität (pH 4-4,5), die durch V-ATPasen aufrechterhalten wird (Martinoia et al. 2007; Isayenkov 2014). Analog zum Lysosom anderer Organismen enthalten lytische Vakuolen hydrolytische Enzyme, die Proteine, Nukleinsäuren und Polysaccharide abbauen (zusammengefasst in Marty 1999). Eine weitere wichtige Funktion der lytischen Vakuole ist die Aufrechterhaltung des Turgordrucks innerhalb der Zelle sowie die Homöostase des Cytoplasmas und die Detoxifizierung der Zelle (Trentmann und Haferkamp 2013). Zudem dient diese zur Speicherung von Ionen, Kohlenhydraten, Aminosäuren und Pigmenten (Isayenkov 2014). Eine weitere Vakuolenart in pflanzlichen Zellen ist die *protein storage vacuole* (PSV), eine im Verhältnis zur lytischen Vakuole, kleinere Vakuole, die darauf spezialisiert ist, wichtige Nährstoffe, Proteine und Sekundärmetabolite zu speichern (Martinoia et al. 2007). Es wurde anfänglich angenommen, dass pro Zelle nur eine Vakuole präsent ist, so dass Speichervakuolen hauptsächlich im reproduktiven Gewebe vorkommen würden. Anhand mikroskopischer Analysen konnte diese Annahme jedoch widerlegt werden (Isayenkov 2014). Aufgrund der vielseitigen Funktionen der Vakuole besitzt der Tonoplast, die Membran der pflanzlichen Vakuole, eine Vielzahl an Transportproteinen, die es erlauben, selektiv Ionen, Kohlenhydrate und weitere Metabolite in das Lumen der Vakuole oder ins Cytoplasma zu transferieren (Debeaujon et al. 2001; Czempinski et al. 2002; Wormit et al. 2004; Endler et al. 2006; Yamada et al. 2010)

Noch nicht sehr gut erforscht sind die Vakuolen der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*. *P. tricornutum* speichert in einer Vakuolen-ähnlichen Struktur Chrysolaminarin, ein β -1,3-Glukan, das über β -1,6-Verlinkungen Glukose glykosidisch bindet (Beattie et al. 1961; Ford und Percival 1965). Chrysolaminarin dient ähnlich der Stärke bei den Chlorophyten und Embryophyten als Reservestoff, das durch hydrolytische Spaltung mithilfe von Glykosidasen gespalten werden kann (Kroth et al. 2008). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *P. tricornutum* zeigten zwei Vakuolen-ähnliche Strukturen, die anhand der unterschiedlichen Elektronendichte zur

Unterscheidung in der vorliegenden Arbeit als *dense vacuole* bzw. *marbled vacuole* oder zentrale Vakuole bezeichnet werden (Abb. 4). Letztere ist dazu befähigt Chrysolaminarin zu speichern (Chiovitti et al. 2004).

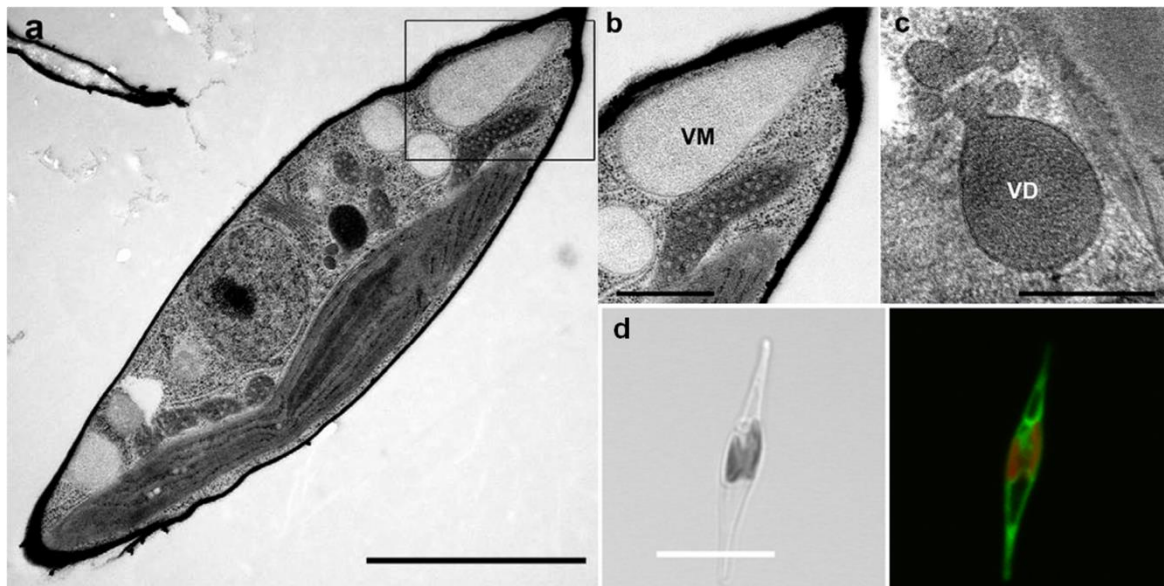


Abbildung 4: Vakuolen-ähnliche Strukturen in *Phaeodactylum tricornutum*. (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Phaeodactylum tricornutum* Maßstab= 2,5 µm. (b) und (c): Vergrößerte Aufnahmen der *marbled* (VM) und *dense vacuole* (VD) Maßstab= 500 nm. (d): lichtmikroskopische und konfokale Laser Scanning Aufnahme einer *P. tricornutum* Zelle, dessen Vakuolenmembran mit MDY-64 markiert wurde. Maßstab= 10 µm (modifiziert nach Gonzalez et al. 2011).

1.3 Proteintransport in lysosomale Kompartimente und Speichervakuolen

1.3.1 Der sekretorische Weg

Durch die Kompartimentierung einer eukaryotischen Zelle wird für den Austausch von Proteinen, Lipiden und Polysacchariden ein Transportsystem benötigt, das es erlaubt die verschiedenen Membranen der Organellen zu überwinden. Zur Überwindung der Membranen dienen Vesikel, die sich an der Ausgangsmembran abschnüren und mit der Zielmembran verschmelzen. Wichtig dabei ist nicht nur der Transport zur Zielmembran, sondern auch der Rücktransport von Proteinen und Lipiden, um die Zusammensetzung der Kompartimente aufrecht zu erhalten. Damit ein Protein über das Endomembransystem bzw. über den sekretorischen Weg zum Lysosom/Vakuole oder zur Plasmamembran transportiert werden kann, werden spezifische Zielsteuerungssequenzen benötigt, die bei vakuolären Proteinen N-terminal, C-Terminal oder innerhalb der Proteinsequenz liegen können (s. Kap. 1.3.2) (Martoglio und Dobberstein 1998; Larisch et al. 2012; Wolfenstetter et al. 2012; Gao et al. 2014). Ausgangspunkt des sekretorischen Wegs ist für sekretorische Proteine das ER, in das neu-synthetisierte Proteine über kotranslationale Translokation mittels eines N- terminalen Signalpeptids oder einer hydrophoben Transmembrandomäne in das Lumen oder in die ER-Membran integriert werden (Lodish et al. 2000). Nach der Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids mittels einer luminalen Peptidase wird durch Chaperone des ERs die korrekte Faltung

des Proteins gewährleistet und erleichtert, zeitgleich wird der N-terminus des Proteins kotranslational glykosyliert (Vitale und Denecke 1999). Nur korrekt gefaltete, assemblierte und modifizierte Proteine passieren die Qualitätskontrolle des ER und werden weiter zum Golgi-Apparat transportiert. Proteine, die nicht korrekt gefaltet wurden, werden für den Abbau über das Proteasom ins Cytosol transloziert (Brandizzi et al. 2003). Der Transport vom ER zum cis-terminalen Bereich des Golgi-Apparats (auch anterograder Transport genannt) erfolgt an sogenannten ER *export sites*, bei denen die zu transportierenden Proteine in *coat protein complex II* (COPII)-Vesikel verpackt werden (Abb. 5) (Aridor und Balch 2000). Der COPII-Komplex besteht aus einer GTPase (Sar1) und zwei Heterodimeren, bestehend aus Sec13/31 und Sec23/24 (Hicke et al. 1992; Barlowe und Schekman 1993; Pryer et al. 1993; Salama et al. 1997). Durch den Austausch an Sar1 von GDP zu GTP wird die Rekrutierung der cytoplasmatisch lokalisierten Komplexe Sec13/31 und Sec23/24 initiiert. Die Assemblierung der Sec-Komplexe führt zur Abschnürung des COPII-Vesikels (Barlowe 2000). Der retrograde Transport, d.h. vom Golgi-Apparat zum ER bzw. von der trans-zur cis-Seite des Golgi-Apparats, erfolgt über COPI-Vesikel, die aus einem Coatomer, bestehend aus sieben Hüllproteinen und der GTPase ARF1 bestehen (Serafini et al. 1991; Waters et al. 1991). Der Nukleotidaustausch von ARF1-GDP zu ARF1-GTP wird über den Nukleotid-Austauschfaktor GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) katalysiert (Jackson und Casanova 2000). Durch die Konformationsänderung von ARF1 wird dieses in der Membran verankert, im Anschluss wird das Coatomer aus dem Cytosol rekrutiert (Donaldson et al. 1992a). Die Abschnürung des COPI-Vesikels wird durch die Hydrolyse von ARF1-GTP zu ARF1-GDP initiiert (Tanigawa et al. 1993). Eine Inhibierung des retrograden Vesikeltransports inhibiert zusätzlich den COPII-vermittelten Transportweg, wodurch vermutet wird, dass die Formierung von COPII-Vesikeln von den Komponenten des COPI-Komplexes abhängig ist (Stefano et al. 2006).

Während der Transport über COP-Vesikel dem frühen sekretorischen Weg zugeordnet ist, erfolgt der späte sekretorische Transport, d.h. vom Trans-Golgi-Netzwerk/frühem Endosom zur Plasmamembran oder den lytischen Kompartimenten über *clathrin coated vesicles* (CCV). Auch der endocytotische Transport von der Plasmamembran über das Endosom zu lytischen Kompartimenten wird über CCV vermittelt (Nickel und Wieland 1998; zusammengefasst in Hirst und Robinson 1998). Clathrin besteht aus drei schweren und drei leichten Ketten, die sich zu einem Triskelion zusammenfügen und sich um das Vesikel herum anlagern (Ungewickell und Branton 1981). Die Formierung des Clathrincoats wird wie bei COP-Komplexen über eine GTPase reguliert. CCV können Proteine ebenfalls über prävacuoläre Kompartimente (*prevacuolar compartments*, PVC) oder *multi vesicular bodies* (MVB) transportieren. PVC und MVB entsprechen dem späten Endosom in Säugerzellen, das Proteine an das Lysosom bzw. an die Vakuole weitergibt (Friend und Farquhar 1967; Deloche et al. 2001; Tse et al. 2004).

Die Fusion der Vesikel mit der Ziellmembran erfolgt nach der Ablösung der Hüllproteine vom Membranvesikel. Die Hüllproteine dissoziieren durch die hydrolytische Aktivität der GTPasen und werden für das *coaten* neuer Vesikel recycelt (Rothman und Wieland 1996). Die freien Vesikel besitzen auf ihrer Oberfläche Rab-Proteine, GTPasen, die durch Interaktion mit ihrem komplementären Ziellmembran-gebundenen Rezeptor den Kontakt zwischen Vesikel und Ziellmembran herstellen (zusammengefasst in Stenmark 2009). Zur Überwindung des hydrophilen Zwischenraums zwischen Vesikel und Ziellmembran werden spezifische Fusionsproteine, sogenannte *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors* (SNARE)-Proteine, benötigt, die ebenfalls in den zu fusionierenden Membranen lokalisiert sind. So wird durch das Interagieren von v- und t-SNARE-Proteinen, die eine tetrahelikale Struktur ausbilden, das Fusionieren der Vesikel- und Ziellmembran gewährleistet (Glick und Rothman 1987; Malhotra et al. 1988; Beckers et al. 1989). Für den vakuolären Proteintransport in *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass das Rab7-Protein und das SNARE-Protein SYP21 beim Transport vom PVC zum Tonoplasten involviert sind (Uemura et al. 2010; Bottanelli et al. 2011).

Neben dem sekretorischen Weg wurde in Pflanzen ein Transportweg identifiziert, dessen Transportroute zur Vakuole den Golgi-Apparat auslöst und somit als Golgi-unabhängiger Transport bezeichnet wird. Hierbei verlassen Proteine das ER und wandern über *precursor accumulating compartments* (PAC) zum prävakuolären Kompartiment (Rojas-Pierce 2013). Erste Beobachtungen eines Golgi-unabhängigen Transports wurden in Protoplasten gemacht, die transient das Aquaporin Tip3.1 exprimierten. Nach einer Behandlung mit Brefeldin A (BFA) konnte gezeigt werden, dass trotz eines gestörten COP-Vesikeltransportes das Aquaporin dennoch in den Tonoplasten transportiert werden konnte (Park et al. 2004). Der Mechanismus des Golgi-unabhängigen Transports ist bis heute allerdings unerforscht.

Für den Transport von vakuolären Proteinen spielen neben den Komponenten des Endomembransystems weitere Faktoren eine wesentliche Rolle, die in den folgenden Kapiteln

näher beschrieben werden.

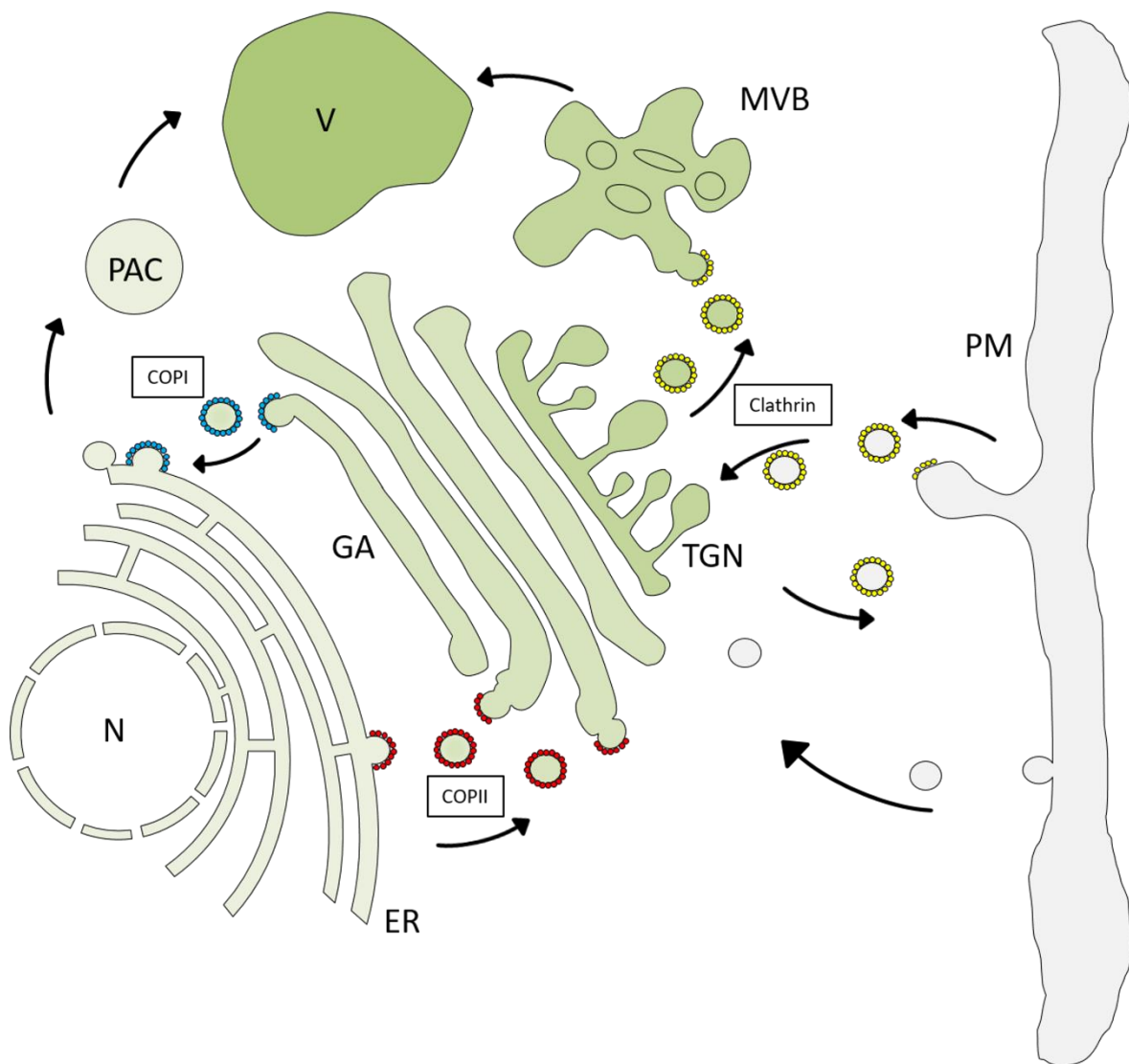


Abbildung 5: Das Endomembransystem und der sekretorische Weg. Der frühe sekretorische Weg erfolgt über die Coatomere COPI und COPII. COPII- umhüllte Vesikel vermitteln den anterograden Transport vom ER zur cis-Seite des Golgi-Apparats sowie innerhalb der Golgi-Stapels zur trans-Seite (COPII-Vesikel in rot gekennzeichnet). Der retrograde Transport des frühen sekretorischen Wegs erfolgt über COPI-Vesikel (COPI-Vesikel in blau dargestellt). Der späte sekretorische Weg erfolgt sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung über Clathrin-umhüllte Vesikel (in Gelb dargestellt). Über den AP3-Komplex wird Clathrin für den vakuolären Transport rekrutiert, der Transport erfolgt über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) über *multi vesicular bodies* (MVB) zur Vakuole. Unabhängig vom sekretorischen Weg können vakuoläre Proteine direkt vom ER über *prevacolar accumulating compartments* (PAC) zur Vakuole gelangen. Der anterograde Transport zur Plasmamembran erfolgt über Clathrin-Vesikel ausgehend vom Trans-Golgi-Netzwerk. Der retrograde Transport ausgehend von der Plasmamembran erfolgt AP2 vermittelt über das TGN zu MVB und anschließend zur Vakuole. N= Nukleus; ER= Endoplasmatisches Retikulum; GA= Golgi-Apparat; PM=Plasmamembran; V= Vakuole.

1.3.2 Targetingmotive

Damit Proteine innerhalb der Zelle zu ihrem Zielort gelangen, sind spezielle Targetingmotive, eine kurze Abfolge einer Aminosäuresequenz innerhalb des Peptids oder auch strukturell determinierte Motive, von großer Bedeutung. So besitzen beispielsweise lösliche Proteine, die im Lumen des ERs lokalisiert sind, ein C-terminales Sortierungssignal ([H/K]DEL oder KKXX) das für die Akkumulierung im ER verantwortlich ist (Munro und Pelham 1987; Cosson und Letourneur 1994). Während in

Saccharomyces cerevisiae und tierischen Zellen dieses ER-Retentionssignal hoch konserviert ist, gibt es in Pflanzen mehrere Variationen dieses Signals (KDEL; HDEL; RDEK, KEEL) (Denecke et al. 1992). Für den Export aus dem ER besitzen Membranproteine ER *exit signals*. In Typ1-Transmembranproteinen wurden *di-acidic* ([D/E]X[D/E]) oder *di-hydrophobic* (FF, LL, YY, FY) Sortierungssignale detektiert, die mit dem Sec23/24-Komplex interagieren (Nishimura und Balch 1997; Aridor et al. 2001; Stockklausner et al. 2001; Nufer et al. 2002). *Di-basic* Motive wurden in Typ2-Transmembranproteinen identifiziert, die direkt mit der GTPase Sar1 interagieren (Giraudo und Maccioni 2003). Diese ER-Exportsignale befinden sich häufig am C-Terminus des Proteins und in unmittelbarer Nähe einer Transmembrandomäne. Werden solche Motive mutiert, ist der ER-Export der modifizierten Proteine nicht mehr gewährleistet, wodurch diese im ER akkumulieren. Gao und Kollegen identifizierten in *A. thaliana* ein Golgi-Retentionssignal (KX[D/E]), das in eukaryotischen Endomembranproteinen (EMP) hoch konserviert ist (Gao et al. 2014).

1.3.2.1 Vacuolar Sorting Determinants (VSD)

Luminale Vakuolenproteine besitzen für ein korrektes *Targeting* entlang des TGN *vacuolar sorting signals* oder *vacuolar sorting determinants* (VSS/VSD). Proteine, die zur Vakuole transportiert werden sollen, werden als Präprotein synthetisiert, die im Vergleich zu ihrem maturen Protein entlang des N- oder C-Terminus ein Propeptid besitzen (Neuhaus und Paris 2005). Fusionen solcher Propeptide an nicht vakuolär-lokalisierte Proteine führten zu einer Akkumulation in der Vakuole, wodurch die ersten vakuolären Sortierungssignale identifiziert wurden (Pedrazzini et al. 1997; Niemes et al. 2010a). VSDs lassen sich in drei verschiedene Klassen unterteilen. Sequenzspezifische Sortierungssignale (ssVSD) befinden sich häufig am N-Terminus des Proteins, können aber auch C-terminal oder innerhalb der Aminosäuresequenz eines Proteins auftreten (Holwerda et al. 1992; Koide et al. 1999). Das Sortierungssignal setzt sich aus den Aminosäuren Asparagin, Prolin, Isoleucin und Arginin (NPIR) zusammen, wobei das Isoleucin eine essentielle Rolle im vakuolären *targeting* übernimmt (Kirsch et al. 1994). Beispiele für ein sequenzspezifisches Targetingsignal sind die Aminosäuresequenz Alanin, Phenylalanin, Valin und Tyrosin (AFVY), das in β -Phaseolin von *P. vulgaris* identifiziert wurde oder Isoleucin, Alanin, Glycin und Phenylalanin (IAGF) eines Albumins (zusammengefasst in Vitale und Hinz 2005). Eine weitere Klasse der VSS ist die der C-terminalen VSD (ctVSD) (Neuhaus und Rogers 1998). Dieses Sortierungssignal ist nur im C-terminalen Bereich des Proteins zu finden und besitzt keine spezifische Konsensussequenz. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass bei solchen Proteinen der C-Terminus einen hydrophoben Bereich aufweist, der für ein korrektes *targeting* in die Vakuole essentiell ist (Dombrowski et al. 1993; Neuhaus et al. 1994). Die dritte Art von VSDs ist abhängig von der Tertiärstruktur des Proteins (psVSD, *physical structure vacuolar sorting determinant*), die Charakteristika dieses VSD sind jedoch nicht ausführlich erforscht (zusammengefasst in Xiang et al. 2013). VSS werden in Pflanzen entweder von Rezeptoren

der *receptor-homology-region-transmembrane-domain-RING-H2* (RMR) -Familie erkannt, die im ER und im TGN lokalisieren, oder von *vacuolar sorting receptors* (VSR), die in Kapitel 1.3.4 näher betrachtet werden (zusammengefasst in Brillada und Rojas-Pierce 2017).

1.3.2.2 Tyrosin- und Dileucinmotive

Membranproteine besitzen für das *targeting* zur Vakuole/zum Lysosom sogenannte Tyrosin- oder Dileucinmotive, die erstmals in Membranproteinen des Lysosoms charakterisiert wurden (Williams und Fukuda 1990; Letourneur und Klausner 1992). Sie konnten in Organismen detektiert und identifiziert werden, die evolutionär betrachtet nur sehr weitläufig verwandt sind, weshalb dieser Targetingmechanismus vermutlich in Eukaryoten generell konserviert ist (Bonifacino und Traub 2003). Tyrosinmotive weisen die Aminosäureabfolge YXX ϕ auf, wobei nach dem Tyrosin zwei variable Aminosäuren und eine Aminosäure mit sperriger Seitenkette (z.B. Phenylalanin, Prolin, Tryptophan) folgen. Das Tyrosin ist für das *targeting* von essentieller Bedeutung und kann durch keine andere aromatische Aminosäure substituiert werden (Bonifacino und Traub 2003). Solche Targetingmotive konnten in endocytotischen Rezeptoren, in intrazellulären Sortierungsrezeptoren wie beispielsweise VSRs, in Proteinen des Trans-Golgi-Netzwerks und in lysosomalen bzw. vakuolären Membranproteinen identifiziert werden (Bonifacino und Traub 2003).

Dileucinmotive bestehen aus einer aciden Aminosäure, gefolgt von zwei bis fünf variablen Aminosäuren und zwei Leucinen, wobei das zweite Leucin durch Isoleucin ([D/E X₂₋₅ L[L/I]]) ersetzt werden kann. Die Substitution der aciden Aminosäure und der Leucine gegen Alanin führt zu einer Mislokalisierung der modifizierten Proteine (Pond et al. 1995; Sandoval et al. 2000). So werden Proteine, dessen Dileucinmotiv mutiert ist, möglicherweise über den *default* Weg zur Plasmamembran transportiert (Wolfenstetter et al. 2012). Weitere Studien mit Aminosäureaustauschmutanten zeigen, dass das Fehlen eines Dileucinmotivs auch zu einer Lokalisation in vesikulären Strukturen führen kann (Yamada et al. 2010).

Neben der konservierten Aminosäuresequenz der Targetingmotive spielt die Position dieser Motive ebenfalls eine wesentliche Rolle. Tyrosin- und Dileucinmotive können entweder im N-terminalen oder C-terminalen Bereich eines Proteins liegen, wobei der Abstand zwischen Targetingmotiv und der nächstliegenden Transmembrandomäne ebenfalls relevant zu sein scheint (Geisler et al. 1998; Larisch et al. 2012; Wolfenstetter et al. 2012). Eine weitere Bedingung für ein aktives Targetingmotiv ist die Topologie des N- oder C-Terminus eines Membranproteins. Dieser muss im Cytoplasma lokalisiert sein, um eine Interaktion mit COPII- oder Adapterproteinkomplexen zu gewährleisten (zusammengefasst in Pedrazzini et al. 2013).

1.3.3 Adapterprotein (AP)-Komplexe

Adapterprotein (AP)-Komplexe binden an Tyrosin- und Dileucin-Targetingmotiven, rekrutieren Clathrin und konzentrieren Cargoproteine in Vesikel, wodurch sie eine essentielle Rolle im Transport von Membranproteinen als Regulatoren einnehmen (Park und Guo 2014). Bis dato konnten fünf AP-Komplexe (AP1-AP5) in Säugerzellen identifiziert werden, wobei *A. thaliana* nur vier dieser AP-Komplexe aufweist (Boehm und Bonifacio 2001). AP-Komplexe sind Heterotetramere bestehend aus zwei großen Untereinheiten (je nach Komplex γ -, α -, δ -, ϵ -, β oder ζ -Adaptin), einer mittleren Untereinheit (μ 1- μ 5-Adaptin) und einer kleinen Untereinheit (σ 1- σ 5-Adaptin) (Tab. 1) (Park und Guo 2014). Einige dieser Untereinheiten sind als multiple Isoformen in einem Organismus vorhanden, die von verschiedenen Genen codiert werden (Mattera et al. 2011). μ -Adaptine können Tyrosin- und Dileucinmotive binden, während die großen Untereinheiten dazu befähigt sind Clathrin zu rekrutieren (Bonifacio und Lippincott-Schwartz 2003; Brodsky 2012). In neueren Publikationen konnte allerdings gezeigt werden, dass beispielsweise das γ -Adaptin des AP1-Komplexes aus *A. thaliana* mit einem Dileucinmotiv interagiert (Wang et al. 2014). Je nach Funktion lokalisieren die AP-Komplexe in verschiedenen Kompartimenten des EMS. AP1, AP3 und AP4 konnten im TGN und in Endosomen lokalisiert werden, wobei AP1 und AP3 mit Clathrin assoziiert werden und AP4 den Transport vom TGN zum späten Endosom Clathrin-unabhängig vermittelt (Park und Guo 2014). AP1 vermittelt den bidirektionalen Transport von CCV zwischen dem TGN und dem späten Endosom, während AP3 spezifische lysosomale/vakuoläre Membranproteine direkt vom TGN zum Lysosom/Vakuole transportiert (Cowles et al. 1997; Dell'Angelica 2009; Guo et al. 2013). In *A. thaliana* agiert AP3 bei der Biogenese der Vakuole sowohl bei lytischen Vakuolen als auch bei der Transition von lytischer zu Speichervakuole (Feraru et al. 2010; Zwiewka et al. 2011). AP2 konnte in der Plasmamembran detektiert werden und unterstützt die über CCV-vermittelte Endocytose (Jackson et al. 2010). Über den neu entdeckten AP5-Komplex ist noch nicht viel bekannt, konnte jedoch im späten Endosom detektiert werden (Hirst et al. 2013).

Tabelle 1: Übersicht der Adapterprotein-Komplexe.

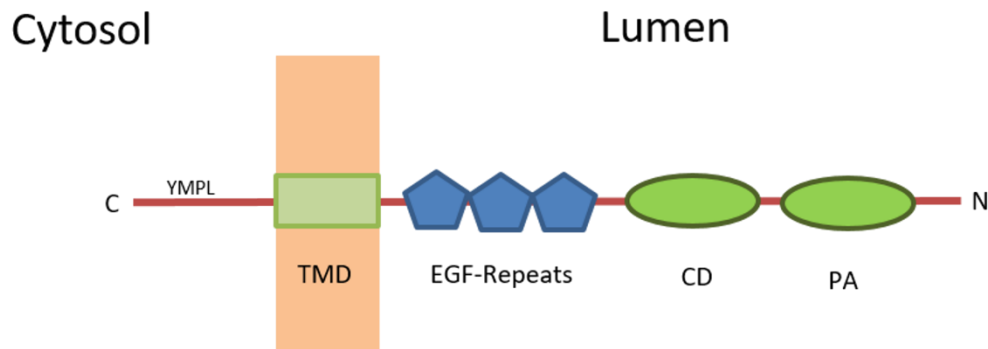
AP-Komplex	Untereinheiten	Lokalisation	Erkanntes Targetingsignal
AP1	γ 1/2, β 1, μ 1, σ 1	TGN, Endosom	YXX Φ [D/E]XXX[L/I]
AP2	α 2, β 2, μ 2, σ 2	Plasmamembran	YXX Φ [D/E]XXX[L/I]
AP3	δ , β 3, μ 3, σ 3	TGN/ Endosom	YXX Φ [D/E]XXX[L/I]
AP4	ϵ , β 4, μ 4, σ 4	TGN	YX[FYL][FL]E
AP5	ζ , β 5, μ 5, σ 5	Spätes Endosom	?

Gezeigt sind die Adapterprotein (AP)-Komplexe mit ihren jeweiligen Untereinheiten, deren Lokalisationsorten und die Targetingsignale, mit denen sie jeweils interagieren.

1.3.4 *Vacuolar Sorting Receptors (VSRs)*

Der Transport von löslichen, vakuolären Proteinen erfolgt über Rezeptoren, die die Proteine anhand ihres Liganden über CCV von post-Golgi über Endosomen zur Vakuole transportieren. Eine Familie solcher Rezeptoren bilden die *vacuolar sorting receptors* (VSR). Ein Vertreter dieser Familie wurde zuerst in einem aufgereinigten Pflanzenextrakt über Affinitätschromatografie aus *P. sativum* isoliert, der als BP-80 (Binding Protein 80 kDa) bezeichnet wurde (Kirsch et al. 1994). VSRs sind Glykoproteine, die integrale Membranproteine des Typ1 darstellen. Sie besitzen eine lange luminaire N-terminale Domäne sowie eine Transmembrandomäne gefolgt von einem zumeist kürzeren C-Terminus, der zum Cytoplasma orientiert ist. Der luminaire Bereich besitzt eine *protease associated* (PA)-Proteindomäne und eine zentrale Domäne (CD, *central domain*), die mit einem Bereich der VSDs interagieren (Abb. 6) (Luo et al. 2014). Bei dieser Interaktion kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die VSR-spezifische Proteindomäne den sequenzspezifischen Bereich eines ssVSD binden kann (Luo et al. 2014). Im luminalen Bereich befinden sich neben der CD- und PA-Proteindomäne drei *epidermal growth factor* (EGF)-Repeats, die vermutlich Ca^{2+} -abhängig bei der Ligandenbindung involviert sind (Luo et al. 2014). Wie die Dissoziation von Rezeptor und Ligand abläuft, ist noch nicht eindeutig geklärt. Zum einen wird postuliert, dass VSRs ihre Cargos binden und über CCV in das PVC transportieren und dort aufgrund des niedrigen pH-Wertes dissoziieren, wodurch das Vesikel mit der Zielmembran fusioniert (Kirsch et al. 1994). Watanabe und Kollegen hingegen postulieren, dass VSRs ihre Cargos bei hoher Ca^{2+} -Konzentration binden (Watanabe et al. 2002). Beim Transport entlang des EMS, d.h. vom ER zum Golgi-Apparat über das TGN, nimmt die Ca^{2+} -Konzentration durch das Fehlen von Ca^{2+} -Pumpen ab, Protonen-Pumpen sind allerdings vorhanden, wodurch das Milieu entlang der Kompartimente in anterograder Richtung zur Vakuole hin angesäuert wird. Bei sinkender Ca^{2+} -Konzentration und niedrigem pH-Wert dissoziieren die Rezeptoren vom Liganden (Robinson und Pimpl 2014). Neben PA- und der VSR-spezifischer Domäne besitzt das Glykoprotein drei N-Glykosylierungsstellen, die für eine hohe Bindungsaffinität zwischen Ligand und Rezeptor essentiell sind (Shen et al. 2014). Der cytoplasmatisch-orientierte C-Terminus weist das Tyrosinmotiv „YMPL“ sowie ein acidisches Dileucin-ähnliches Motiv auf. Das Tyrosinmotiv wird von der μ -Untereinheit eines AP-Komplexes erkannt (Happel et al. 2004), wodurch der Transport über CCV gewährleistet wird und diese zum PVC transportiert werden. Bei einer Deletion der Transmembrandomäne sowie dem C-Terminus, der das Tyrosinmotiv enthält, können VSRs über den *default* Weg in den extrazellulären Raum sekretiert werden (Shen et al. 2013).

A



B

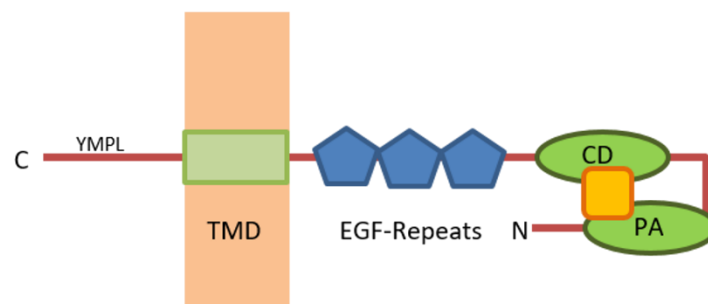


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines VSRs. (A) Der membranständige *vacuolar sorting receptor* (VSR) besitzt im N-terminalen Bereich, der ins Lumen ragt, drei EGF-Repeats (blau), sowie eine zentrale Domäne (CD, central domain) und eine *protease associated* (PA)-Domäne (grün), die bei der Bindung des Liganden involviert ist. Der C-terminale Bereich ragt ins Cytosol und besitzt ein Tyrosinmotiv (YMPL). (B) Bindet der Rezeptor einen Liganden (in gelb dargestellt) kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch *vacuolar sorting determinants* (VSD) gebunden werden können.

Der Bindungsort der Cargos durch VSR wird kontrovers diskutiert. VSRs konnten im ER, im TGN, in CCV und im PVC nachgewiesen werden (Kirsch et al. 1994; Hohl et al. 1996; Sanderfoot et al. 1998; Hinz et al. 2007). Aufgrund einer Akkumulation von Proteinen in ER *protein bodies*, wurde angenommen, dass VSRs ihre Cargos bereits im ER binden (Watanabe et al. 2002). Die Hypothese wurde durch modifizierte Rezeptoren bestärkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass vakuoläre Proteine durch die Interaktion mit der luminalen VSR-Domäne, die wiederum an ein ER-Retentionssignal fusioniert wurde, im ER nachgewiesen werden konnten (Watanabe et al. 2004; daSilva et al. 2005; Niemes et al. 2010a). Da das ER-Retentionssignal ebenfalls relevant für den Transport von Proteine vom Golgi-Apparat zum ER ist, kann das Binden des Liganden entweder im ER, im Golgi oder in beiden Kompartimenten erfolgen. Wie beim Ort der Ligandenbindung gibt es auch mehrere Theorien über den Transport nach der Bindung der Cargoproteine an den Rezeptor. VSR-Mutanten lassen vermuten, dass die Dissoziation des Liganden im PVC stattfindet, von dem aus die Rezeptoren recycelt werden. Ein Modell vermutet, dass VSRs selektiv über AP1 und AP4-Komplexe im TGN über das C-Terminale Tyrosinmotiv rekrutiert werden (Song et al. 2006; Fuji et al. 2016). Über *ap1* und *ap4* knock-outs, die den vakuolären Transport negativ beeinflussten, sowie

Mutationen des Tyrosinmotivs, die zur Folge hatten, dass der Transport vom TGN zur Vakuole beeinträchtigt oder die VSRs über den *default* Weg sekretiert wurden, konnte dieses Modell bestätigt werden (Foresti et al. 2010; Shen et al. 2013). Demnach werden VSRs vom TGN zum PVC über AP-vermittelte CCV zur Ziellmembran transportiert und VSRs und ihre Cargos dissoziieren im PVC. Ein alternatives Modell vermutet, dass ein „*steady-state*“ der VSRs anstelle des PVC im TGN vorhanden ist (Niemes et al. 2010b). Bei diesem Modell werden die VSRs bereits im TGN recycelt, während die Cargoproteine post-Golgi-Kompartimente erreichen (Niemes et al. 2010b; Kunzl et al. 2016). Dieser Proteintransport soll durch die Reifung des TGN zum PVC vermittelt werden, wodurch ein aktiver Transport von Ligand und Rezeptor ausgeschlossen wird (Niemes et al. 2010b; Kunzl et al. 2016).

Unabhängig von beiden Modellen werden die Cargoproteine über PVC zur Vakuolenmembran transportiert, wo die Membranen dieser Kompartimente über die Kaskaden von Rab5- und Rab7-GTPasen fusionieren (Cui et al. 2014).

VSRs sind in Landpflanzen ubiquitär und konnten ebenfalls in Chlorophyten identifiziert werden, jedoch nicht in Rhodophyten und Glaucophyten (Becker und Hoef-Emden 2009). Über phylogenetische Analysen konnte gezeigt werden, dass Stramenopile ebenfalls Gene für pflanzen-ähnliche VSRs besitzen (Becker und Hoef-Emden 2009; Marcos Lousa et al. 2012). Diese lassen vermuten, dass die Gene, die für VSRs codieren, möglicherweise über horizontalen Gentransfer oder durch eine serielle Endosymbiose von der Wirtszelle erworben wurden (Yoon et al. 2002)

1.4 Zielsetzung

Eukaryotische Organismen besitzen lytische Kompartimente wie Vakuolen oder Lysosomen, die bei der Detoxifizierung, der Speicherung von Sekundärmetaboliten oder Degradationsprozessen von Proteinen von essentieller Bedeutung sind (Martinoia et al. 2012). Der Proteintransport sowie Sortiermechanismen von Proteinen, die in lytischen Kompartimenten oder in der Membran dieses Kompartiments lokalisiert sind, konnten in Pflanzen, Pilzen und Säugetieren analysiert und charakterisiert werden (Bonifacino und Traub 2003).

Die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* besitzt mehrere vakuoläre Strukturen. Ein aufgrund ihrer Größe dominantes Kompartiment ist die zentrale Vakuole in *P. tricornutum*, diese dient als Speicherort für Chrysolaminarin und scheint relevant für die Mobilisierung von Kohlenhydraten zu sein (Chiovitti et al. 2004; Kroth et al. 2008). Über weitere Funktionen, den Proteingehalt und über den Proteintransport zu diesem Kompartiment ist nur wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen neben bereits bekannten vakuolären Membranproteinen weitere Proteine in der Vakuolenmembran identifiziert werden, um Kenntnisse über die Funktion und über grundlegende Prozesse hinsichtlich des Proteintransports zu erlangen. Zusätzlich sollen Targetingmotive, die relevant für den Proteintransport in die zentrale Vakuole sind und mögliche Transportrouten identifiziert werden. Des Weiteren sollen anhand von vakuolär-lokalisierten Proteinen vorläufige phylogenetische Analysen durchgeführt werden.

Die Analyse soll auf Basis eines *in silico/ in vivo*-Ansatz erfolgen, in dem potentielle vakuoläre Proteine mittels bioinformatischer Analysen auf N-terminale Zielsteuerungssequenzen, Transmembrandomänen, konservierten Proteindomänen und auf potentielle Targetingsignale untersucht werden. Im Weiteren sollen putative vakuoläre Proteine, welche als eGFP-Fusionsproteine exprimiert werden, *in vivo* hinsichtlich ihrer tatsächlichen Lokalisation untersucht werden, um im Anschluss über gezielte Mutagenese putative Targetingsignale zu identifizieren und verifizieren.

2 Ergebnisse

2.1 Identifizierung von Vakuolenproteinen

In *Phaeodactylum tricornutum* sind nur wenige Proteine bekannt, die in der Membran der zentralen Vakuole oder in deren Lumen lokalisieren. Bekannt sind hauptsächlich Membranproteine wie 1,6- β -Transglykosylasen, die möglicherweise eine Rolle in der Chrysolaminarinbiosynthese spielen (Huang et al. 2016), sowie ein Aquaporin und eine Untereinheit eines ABC-Transporters, dessen Funktion jedoch nicht weiter analysiert wurde (Liu et al. 2016). Kroth und Kollegen konnten anhand von *in silico* Studien Gene für Enzyme im Genom von *P. tricornutum* annotieren, welche eine Rolle im Kohlenhydratmetabolismus spielen könnten (Kroth et al. 2008). Trotz der bereits bekannten Proteine in der zentralen Vakuole von *P. tricornutum*, ist über den Proteintransport zur Vakuole nichts weiter bekannt. Zur Untersuchung des vakuolären Proteintransports wurden in dieser Arbeit weitere putative Vakuolenproteine in der Diatomee identifiziert. Hierfür wurden zwei verschiedene bioinformatische Analysen durchgeführt. Für ein gezieltes Screening des Genoms von *P. tricornutum* wurde in der Datenbank von *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/>) nach Genmodellen gesucht, die sowohl für Proteine codieren, die beim Proteintransport in die Vakuole eine Rolle spielen, als auch nach solchen, die im Tonoplasten oder im Lumen der Vakuole von *A. thaliana* lokalisiert wurden. Der daraus resultierende Datensatz wurde mit der Genomdatenbank von *P. tricornutum* via BLASTp abgeglichen, um zu *A. thaliana* sequenzähnliche, putative Vakuolenproteine zu identifizieren. Bei diesem Screening konnten insgesamt 164 Genmodelle identifiziert werden (s. Tab. 29, von Stefan Zauner zur Verfügung gestellt). Die vorhergesagten Genmodelle (*all filtered models*) wurden aus der *P. tricornutum* Datenbank (<https://genome.jgi.doe.gov/Phatr2/Phatr2.home.html>) extrahiert und zunächst auf ihre Richtigkeit und Vollständigkeit mittels *expressed sequence tags* (EST)-Daten überprüft. Die Überprüfung dieser Genmodelle bezog sich in diesem Fall auf das Screening der *upstream* und *downstream* Region des vorhergesagten Translationsstarts- und endes, um gegebenenfalls weitere Startcodons *in frame* zu identifizieren sowie fehlende Stopcodons zu Genmodellen hinzuzufügen. Ausgehend von diesen Daten besaßen 31 Genmodelle kein Start- bzw. Stoppcodon und somit kein vollständiges 3'- oder 5'-Ende. Diese Genmodelle wurden weitestgehend korrigiert und die abgeleiteten Proteinsequenzen wurden im Anschluss *in silico* Analysen mittels verschiedener Vorhersagetools für Transmembrandomänen (TOPCONS), Signalpeptid (SignalP 3.0) und konservierten Proteindomänen (NCBI, *conserved domain search*) unterzogen (Bendtsen et al. 2004; Marchler-Bauer et al. 2017; Tsirigos et al. 2015) (Abb. 7a). Anhand der konservierten Proteindomänen konnten die vorhergesagten Proteine in verschiedene Proteinklassen unterteilt werden. 10 % der Proteine konnte als V-ATPasen identifiziert werden, die denselben prozentualen

Anteil aufweisen wie Transmembranproteine der *major facilitator superfamily* (MFS). Zu dieser Proteinfamilie gehören unter anderem Zuckertransporter sowie Nitrattransporter (Yan 2015). 3 % der Proteine gehören der Klasse der *major intrinsic proteins* an, die bereits subzellulär in *P. tricornutum* lokalisiert wurden (Liu et al. 2016). Des Weiteren konnten ABC-Transporter (7 %), Proteine mit einer *multidrug antimicrobial extrusion* (MATE)-Domäne (2 %) bzw. mit einer *endomembrane protein 70*-(EMP70)-Domäne (4 %) sowie Proteine mit einer potentiellen hydrolytischen Aktivität (21 %) identifiziert werden. Unter der Kategorie „*protein targeting*“ sind die Proteine zusammen gefasst, die beim Proteintransport zur Vakuole eine Rolle spielen könnten. Zu ihnen gehören beispielsweise Untereinheiten der Adapterprotein (AP)-Komplexe und Proteine, die als *vacuolar protein sorting-associated proteins* (VPS) in der *P. tricornutum* Datenbank annotiert wurden. Es wurden weiterhin Proteine mit DUF-Domänen (*domain of unknown function*) identifiziert sowie Proteine, die keiner eindeutigen Proteinklasse zugeordnet werden konnten und als „Sonstige“ Proteine bezeichnet wurden (s. Abb. 7a). Für 61 % der Proteine konnte mindestens eine Transmembrandomäne (TMD) und für 30 % ein Signalpeptid vorhergesagt werden (Abb. 7b)

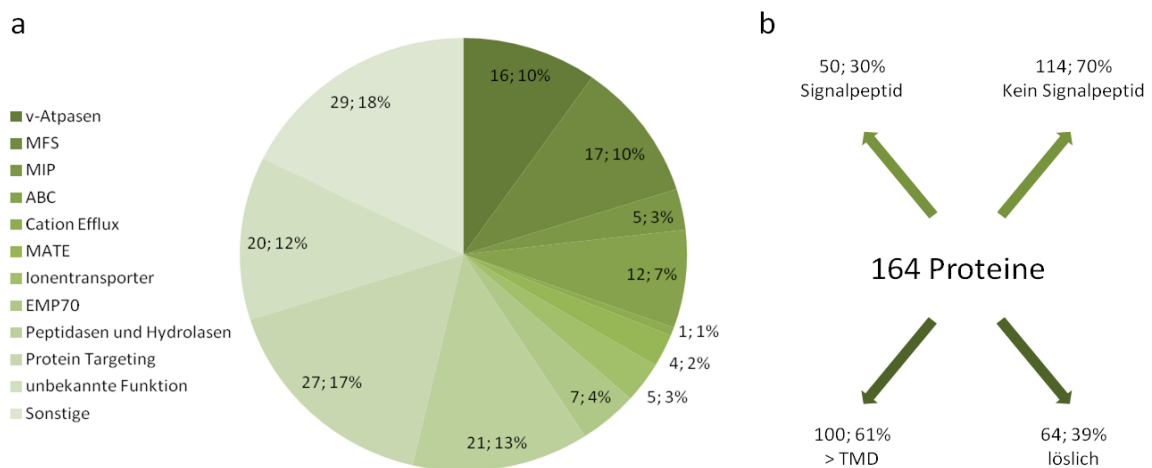


Abbildung 7: In silico Analysen von *P. tricornutum* Proteinen zur Identifizierung von neuen vakuolären Proteinen. a: vorhergesagte Proteinklassen basierend auf der Identifizierung konservierter Domänen. b: Schematische Darstellung der Resultate zur Vorhersage von Transmembrandomänen (TMD) und Signalpeptiden.

Der zweite Versuchsansatz für die Identifizierung von Proteinen mit möglicher Lokalisation in der Vakuolenmembran oder in der Vakuole selbst, geht auf die bereits in der Vakuolenmembran lokalisierten Proteine ABC3 und TIP1 zurück. Bei diesen Proteinen wurde jeweils am N-Terminus ein mögliches Tyrosinmotiv mit der Aminosäuresequenz „YGSI“ identifiziert, welches möglicherweise beim Transport dieser Membranproteine eine Rolle spielt (Bonifacino und Traub 2003). In BLASTp wurde das putative Tyrosinmotiv „YGSI“ als Suchanfrage gestellt und die Genomdatenbank von *P. tricornutum* nach Genmodellen durchsucht, die dieses Motiv in ihrer Aminosäuresequenz besaßen. Bei diesem Screening wurden insgesamt 25 Genmodelle (*all filtered models*) identifiziert, die das potentielle Tyrosinmotiv „YGSI“ besitzen. Wie beim gezielten Screening wurden die

Genmodelle ebenfalls auf ihre Richtig- und Vollständigkeit überprüft und *in silico* Analysen zur Vorhersage von Signalpeptid, Transmembrandomäne und konservierten Proteindomänen durchgeführt (Tab. 2). Darüber hinaus wurde überprüft, ob sich das potentielle Tyrosinmotiv in einer vorhergesagten Transmembrandomäne oder in einem cytoplasmatischen Bereich befindet.

Tabelle 2: Zusammenfassung des Screenings für putative Vakuolenproteine basierend auf dem möglichen Tyrosinmotiv „YGSi“.

Protein ID	Anzahl TMD	Signalpeptid (+/-)	Konservierte Proteindomänen	YGSi Position in AA-Sequenz	YGSi (TMD/Cyt.)
40606	0	-	PDZ2, Rav1p, SH2	1024-1027	/
47879	0	-	DLD, S1_like, SH2_Nterm_SPT6_like, and SH2_Cterm_SPT6_like	1720-1723	/
47548	0	-	/	423-426	/
33116	14	-	AdoMet_MTases and MFS domain-containing protein	911-914	TMD
55073	0	-	AP2 super family	381-384	/
46976	1	-	Glyco_hydro_81 super family	21-24	Cyt.
36312	7	-	RSN1_TM, PHM7_cyt, and RSN1_7TM	45-48	TMD
47154	0	-	AdoMet_MTases, PLPDE_IV, DIOX_N, and 2OG-Fell_Oxy	452-455	/
43024	0	-	TPR_8 and TPR_10 domain-containing protein	308-311	/
44950	8	+	MFS transporter	68-71	Cyt.
46582	0	-	Glyco_hydro_1, DUF4981, and Bgal_small_N	292-295	/
47060	1	-	Abhydrolase super family	10-13	Cyt.
43925	0	+	sec-independent translocase; Provisional	92-95	/
34884	0	+	alpha/betahydrolase	244-247	/
43179	0	-	zf-CW domain-containing protein	90-93	/
46409	0	-	/	282-285	/
47586	0	+	Herpes_BLLF1	61-64	/
45961	1	+	Tryp_SPc domain-containing protein	355-358	Cyt.
47587	0	+	/	61-64	/
16341	3	+	UAA transporterfamily	18-21	TMD
43860	0	+	Chloroa_b-bind domain-containing protein	271-274	/
20755	6	-	MIP super family	4-7	Cyt.
16357	0	-	AAA_12 domain-containingprotein	234-237	/
37266	0	-	P-loop_NTPase super family	148-151	/
37058	0	-	/	21-24	/

Aufgelistet wurden die Genmodelle mit ihrer Protein ID aus der Genomdatenbank von *Phaeodactylum tricornutum* und die Ergebnisse der *in silico* Analysen. TMD= Transmembrandomäne; AA-Sequenz= Aminosäuresequenz; Cyt.= Cytosolisch. /= keine Transmembrandomäne vorhergesagt.

Acht von 26 Genmodellen besitzen mindestens eine Transmembrandomäne (33116, 46976, 36312, 44950, 47060, 45961, 16341, 20755) wovon vier ein vorhergesagtes Signalpeptid aufweisen (s. Tab. 2). Bei fünf dieser potentiellen Transmembranproteine liegt das putative Tyrosinmotiv innerhalb eines vorhergesagten cytoplasmatischen Bereichs (46976, 44950, 47060, 45961, 20755).

Da sich bei diesem Screening keine eindeutige Proteinklasse ermitteln ließ, wurde hier auf eine Einordnung in Proteinklassen verzichtet und die *in silico* untersuchten Proteine im weiteren Verlauf als „YGSI“-Proteine bezeichnet.

Aus den generierten Datensätzen, bestehend aus sequenzähnlichen Proteinen zu *A. thaliana* sowie Proteinen, die das putative Tyrosinmotiv „YGSI“ besitzen, wurden insgesamt 59 Genmodelle genauer untersucht (Tab. 3). 36 dieser überprüften Genmodelle konnten als eGFP-Fusionskonstrukte exprimiert und *in vivo* auf ihre subzelluläre Lokalisation hin untersucht werden. Insgesamt wurden 25 der potentiellen Vakuolenproteine *in vivo* lokalisiert, von denen 13 Proteine entweder ein spezifisches Fluoreszenzmuster für die Vakuolenmembran aufwiesen oder mittels Elektronenmikroskopie im Lumen der Vakuole lokalisiert wurden.

Tabelle 3: Übersicht der bearbeiteten Genmodelle.

Proteinklasse/Funktion	Analysierte Genmodelle	Als eGFP Fusionskonstrukt vorhanden	Lokalisiert	Lokalisiert in der Vakuole	Bemerkung
MFS	15	10	6	2	
ABC-Transporter	12	3			
Hydrolasen und Peptidasen	5	3	3	2	
VacuolarSortingReceptors (VSR)	3	3	3		Bereit gestellt von Carina Happel
AP-Untereinheiten	8	8	6		
Kaliumkanäle	5	4	2	1	
Vacuolar Transport Chaperon (VCT2)	4	2	2	1	Bereit gestellt von Oliver Bäcker
MATE-Transporter	4	2	2	2	
Sonstige	3	3	3	2	
TIP1				1	Bereit gestellt von Xiaojuan Liu
ABC3				1	Bereit gestellt von Xiaojuan Liu
CBS				1	Bereit gestellt von Simone Stork
Gesamt	59	36	25	13	

Aufgelistet wurden alle Genmodelle, die mittels bioinformatischen Tools überprüft wurden und als Fusionskonstrukte vorliegen.

In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels werden die Ergebnisse beider Screeningansätze dargestellt und sind zur Vereinfachung nach Proteinklassen oder nach ihrer vorhersagten Funktion gegliedert.

2.2 Charakterisierung der zentralen Vakuole von *Phaeodactylum tricornutum*

2.2.1 Major Facilitator Superfamily (MFS)

Transporter der *major facilitator superfamily* (MFS) sind ubiquitär in Prokaryoten und Eukaryoten vorhanden und repräsentieren die größte Familie von sekundär-aktiven Transportern (Yan 2015).

Innerhalb dieser Superfamilie werden die Transporter in 58 Subfamilien unterteilt, die Uniporter, Symporter und Antiporter beinhaltet (Law et al. 2008). Ein Großteil dieser Transporter besitzt 12 Transmembrandomänen, die durch hydrophile Bereiche miteinander verbunden sind (Lemieux 2007). Die Aminosäuresequenzen der Transporter innerhalb der Superfamilie weisen eine geringe Ähnlichkeit auf, dennoch konnte an äquivalenten Positionen jeweils in den Loops zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 bzw. 8 und 9 eine hochkonservierte Sequenzabfolge identifiziert werden (Law et al. 2008).

Aus der gezielten bioinformatischen Analyse konnten 17 Proteine der MFS zugeordnet werden, die eine Sequenzähnlichkeit zu den Monosaccharidtransportern AtTMT1 (AT1G75220), ESL1 (AT1G08920) und zu dem Glukosetransporter AtVGT1 (AT3G51490) aus *A. thaliana* aufweisen.

Anhand des gezielten Screenings der *P. tricornutum* Datenbank konnten 9 putative Zuckertransporter detektiert werden, die eine Sequenzähnlichkeit zu tonoplastidären Zuckertransportern von *A. thaliana* zeigten (Tab. 4). Für keines der Proteine wurde ein N-terminales Signalpeptid oder einen Signalanker vorhergesagt. Die *in silico* Analysen ergaben für alle Proteine zwölf vorhergesagte Transmembrandomänen sowie eine C-terminale, hochkonservierte Aminosäureabfolge (PETKG), die in der Proteinsequenz von Zuckertransportern charakteristisch ist (Marger und Saier 1993). Die Anzahl der Transmembrandomänen lässt auf die Einordnung in die Genfamilie der MST oder SUT schließen (zusammengefasst in Büttner und Sauer 2000). Durch die NCBI *conserved domain search* wurden für alle putativen Zuckertransporter eine MFS-1 *superfamily* sowie eine *sugar transporter superfamily*-Domäne detektiert. Für die Genmodelle 9947, 27361, 30620, 18469, 11826, 47769 und 23260 wurden zusätzlich eine xyle-Domäne, welche für D-Xylose Transporter bakteriellen Ursprungs charakteristisch ist, detektiert sowie eine L-Arabinose Isomerase (AraJ)-Domäne. 11826 weist zusätzlich zur MFS-1 und *sugar transporter superfamily*-Domäne nur die xyle-Domäne auf. 45672 besitzt neben der xyle-Domäne mit einer geringen Wahrscheinlichkeit eine charakteristische Proteindomäne für Kation-Transportproteine, während 46251 neben der AraJ-Domäne mit einem e-Wert von $3e-51$ eine Proteindomäne aufweist, die spezifisch in der Superfamilie der *synaptic vesicle proteins* (SV2) zu finden ist. Die Genmodelle konnten weitestgehend mit EST-Daten abgedeckt werden, wodurch die Genmodelle für VCT1, VCT4 und VCT7 korrigiert werden konnten.

Tabelle 4: Identifizierte Zuckertransporter der MFS-Superfamilie.

Pt. ID (filtered model ID), Name	At. Homolog, e-Wert	Konservierte Proteindomäne	Anmerkung	Lokalisation
9947, VCT1	AT2G20780 1e-88	xyle AraJ	5'-Bereich anhand von-EST Daten verlängert	n.d.
27361, VCT2	AT2G35740 8e-99	xyle AraJ		(c)ER
30620, VCT3	AT4G35300 5e-49	xyle AraJ		V
18469, VCT4	AT3G02410 5e-48	xyle AraJ	C-Terminus anhand von EST-Daten verlängert	unspezifisch
45672, VCT5	AT3G02410 3e-12	xyle 2A0119		n.d.
46251, VCT6	AT1G20840 9e-15	AraJ Synapt_SV2 PRK11551		V
11826, VCT7	AT3G02410 9e-100	xyle	C-Terminus anhand von EST-Daten verlängert	?
47769, VCT8	AT2G20780 3e-97	xyle AraJ		PM
23260, VCT9	AT2G20780 6e-96	xyle AraJ		n.d.

Aufgelistet sind die identifizierten Zuckertransporter von *P. tricornutum* mit ihren jeweiligen Protein IDs und ihren Namen sowie ihre konservierte Proteindomänen. Die Protein IDs stammen aus der *P. tricornutum* bzw. der *A. thaliana*-Datenbank. Pt: *Phaeodactylum tricornutum*, At: *Arabidopsis thaliana*, VCT= vacuolar carbohydrate transporter, SV= synaptic vesicle, cER= chloroplast Endoplasmatisches Retikulum, n.d.= nicht determiniert, V= Vakuole, P= Plastide, PM= Plasmamembran

Zur weiteren Untersuchung dieser identifizierten Zuckertransporter mit möglicher Lokalisation in der Vakuolenmembran wurden *in vivo* Lokalisationsstudien mit eGFP-Fusionsproteinen durchgeführt (Abb. 8). Zu diesem Zweck wurden die VCT-codierenden Sequenzen aus cDNA amplifiziert und mit Ausnahme von VCT2 die Konstrukte so designt, dass eGFP C-terminal an das Protein fusioniert wurde. Da für VCT2-eGFP nach 48 h Induktion keine Fluoreszenz detektiert werden konnte, wurde ein neues Fusionskonstrukt generiert. Hierfür wurde die codierende Sequenz für eGFP in den cytoplasmatischen Bereich zwischen den Transmembrandomänen 10 und 11 von *vct2* kloniert.

VCT2 zeigt eine geringe Sequenzähnlichkeit zu dem Inositoltransporter INT2 (AT2G35740) aus *A. thaliana*, welcher in der Plasmamembran lokalisiert wurde (Schneider et al. 2008). Die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins VCT2-eGFP_{TM10/11} in *P. tricornutum* zeigt eine (c)ER-ähnliche Lokalisation, bei der eine Fluoreszenz sowohl um die Plastide selbst als auch um den Zellkern herum erkennbar ist. Eine nicht eindeutige Lokalisation konnte für VCT4-eGFP gezeigt werden, während VCT7-eGFP eine bis mehrere punktartige Fluoreszenzmuster im Zentrum der Zelle aufweist. VCT8-eGFP hingegen zeigt eine Fluoreszenz, die die Zelle ganz umschließt und auf eine Lokalisation in der Plasmamembran schließen lässt. VCT3-eGFP und VCT6-eGFP, welche eine

Ähnlichkeit zu den Aminosäuresequenzen der Tonoplastproteine TMT1 bzw. TMT2 aus *A. thaliana* aufweisen, zeigen hingegen ein Fluoreszenzmuster, welches die Zelle in zwei „Flügel“ separiert. Dieses Fluoreszenzmuster ist vergleichbar mit dem des Vakuolenmembranmarkers MDY-64 (s. Abb. 4) und charakteristisch für eine Lokalisation in der Membran der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* (Liu et al. 2016; Huang et al. 2016).

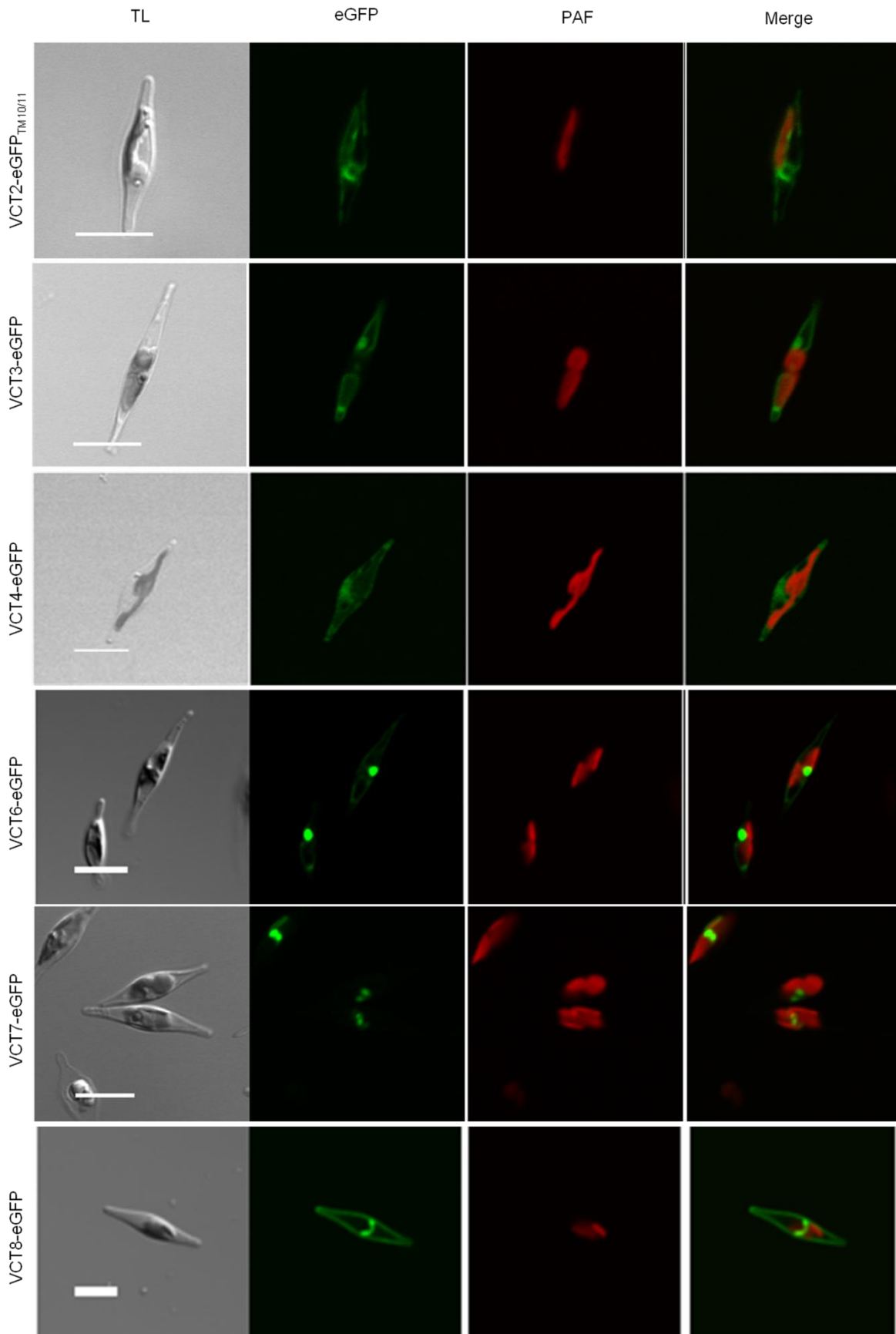


Abbildung 8: Subzelluläre Lokalisation der identifizierten VCTs in *P. tricornutum*. VCT2, VCT3, VCT4, VCT6, VCT7 und VCT8 wurden als eGFP-Fusionsproteine mithilfe des Nitratreduktase-Promotors exprimiert. VCT2-eGFP zeigte eine Lokalisation im cER, während für VCT7-eGFP punktförmige Fluoreszenzen in der Nähe der Plastide detektiert werden

konnten. VCT4-eGFP hingegen zeigte ein unspezifisches eGFP-Signal. VCT8-eGFP konnte durchgängig um die gesamte Zelle herum detektiert werden, wodurch auf eine Lokalisation in der Plasmamembran geschlossen werden kann. Das Fluoreszenzmuster von VCT3-eGFP und VCT6-eGFP hingegen umschließt nicht durchgängig die Zelle, sondern separiert diese in zwei „Flügel“, die charakteristisch für eine Lokalisation in der Vakuolenmembran ist. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= Plastidenautofluoreszenz; Merge = Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab = 10 μm . (Abbildung von VCT4-eGFP aus Dersch 2016)

2.2.2 Kaliumkanäle und Ionentransporter

Eine weitere Art von Transmembranproteinen, die beim gezielten Screening der *P. tricornutum* Genomdatenbank identifiziert werden konnten (s. Kap. 1.1) sind putative Kaliumtransporter, die eine Ähnlichkeit zu den Aminosäuresequenzen der *two pore* Kaliumkanäle TPK1-TPK5 zeigten. Ein charakteristisches Merkmal für ein Monomer der *two pore* Kaliumkanäle sind vier Transmembrandomänen und zwei *pore* Regionen sowie mindestens eine C-terminale EF Hand Domäne, die es erlaubt Ca^{2+} zu binden und somit die Aktivität solcher Kaliumtransporter durch Calcium reguliert (Gobert et al. 2007; Isayenkov et al. 2011).

Anhand des gezieltes Screenings konnten fünf putative Kaliumkanäle in *P. tricornutum* identifiziert werden (3676; 43530; 43171; 38821; 46302), für die sowohl zwei Ionentransporter-Proteindomänen als auch ein C-terminales EF-Hand Motiv detektiert werden konnte (Tab. 5). Der Aufbau dieser Proteine als auch die Anzahl von vier bis sechs Transmembrandomänen lässt auf Kaliumkanäle schließen, die der Klasse der *two pore* Kaliumkanäle angehören. Zusätzlich wurde ein Ionentransporter identifiziert (23557), bei dem im Gegensatz zu den identifizierten Kaliumkanälen mittels der *conserved domain search* eine *cation efflux superfamily*-Proteindomäne sowie eine Zinktransporter-Domäne detektiert wurde. Laut SignalP3.0 besitzt TPK1 einen Signalanker, während für TPK3 und TPK4 ein Signalpeptid vorhergesagt wurde. Das Genmodell für *tpk1* konnte anhand von EST-Daten korrigiert werden, mithilfe einer Amplifizierung aus cDNA konnten die Genmodelle für *tpk1*, *tpk2*, *tpk3*, *tpk5* und *cat1* verifiziert und für *in vivo* Lokalisationsstudien weiter verwendet werden. Das Genmodell für *tpk4* konnte aufgrund eines *frame shifts* für eine subzelluläre Lokalisation nicht berücksichtigt werden.

Tabelle 5: Identifizierte putative Kaliumkanäle und Ionentransporter.

Pt. ID (filtered model ID), Name	At. Homolog, e-Wert	Konservierte Proteindomäne	Anmerkung	Lokalisation
3676, TPK1	AT5G55630 9e-42	Ion_trans2 EFh	N- und C-terminal verlängert Signalanker	n.d.
43530, TPK2	AT5G55630 3e-27	Ion_trans2 EFh		V
43171, TPK3	AT4G02300 1e-27	Ion_trans2 EFh	SP	P
38821, TPK4	AT5G55630 1e-23	Ion_trans2 EFh	Genmodell inkorrekt SP	
46302, TPK5	AT4G18160 2e-06	Ion_trans2 EFh		PM
23557, CAT1	AT3G53360 2e-58	Cat_efflux Zinc_transporter		V

Aufgelistet sind die identifizierten Kaliumkanäle und Ionentransporter von *P. tricornutum* mit ihren jeweiligen Protein IDs und ihren Namen sowie ihre konservierte Proteindomänen. Die Protein IDs stammen aus der *P. tricornutum* bzw. der *A. thaliana*-Datenbank. Pt=*Phaeodactylum tricornutum*; At= *Arabidopsis thaliana*; TPK= *two pore potassium channel*; CAT= *cation efflux transporter*, Ion_trans= *ion transporter*, EFh= *EF hand motif*; SP=Signalpeptid; V= Vakuole; P= Plastide; PM= Plasmamembran; n.d.= nicht determiniert.

Die *in vivo* Lokalisationsstudien von TPK2 und CAT1, an deren C-terminalen Ende eGFP fusioniert worden ist, ergaben eine Vakuolenmembran-Lokalisation, während TPK5 in der Plasmamembran lokalisiert wurde (Abb. 9). Die subzelluläre Lokalisation von TPK3 resultierte in einem Fluoreszenzmuster, das vollständig mit der Plastidenautofluoreszenz überlagert, weshalb dieser putative Kaliumkanal in einer der Membranen der komplexen Plastide lokalisiert ist.

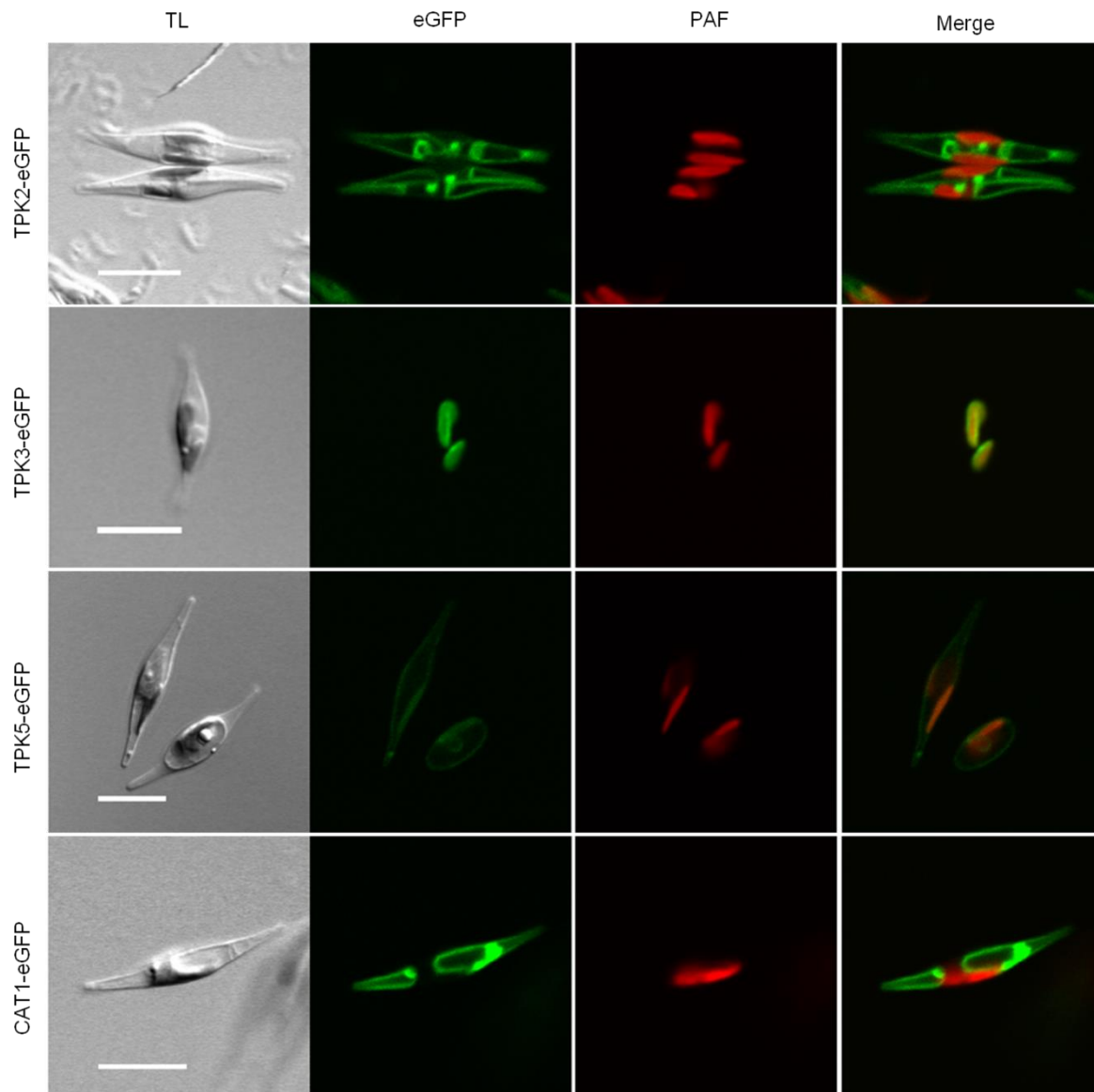


Abbildung 9: Subzelluläre Lokalisation der identifizierten TPKs und CAT1. Die Expression von CAT1-eGFP und TPK2-eGFP resultieren in einem Vakuolenmembran-charakteristischen Fluoreszenzmuster, wohingegen TPK5-eGFP in der Plasmamembran und TPK3-eGFP in der Plastide lokalisiert sind. Die Fusionsproteine wurden mithilfe des Nitratreduktase-Promotors exprimiert. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge = Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab = 10 µm. (Abbildung von TPK2-eGFP aus Zachert 2017)

2.2.3 Sonstige Membranproteine

Unter sonstige Proteine sind unter anderem Proteine mit einer *multidrug and toxic extrusion compartment* (MATE)-Domäne, eine Untereinheit des *vacuolar transport chaperons* (VTC) sowie Proteine, die ein putatives Tyrosinmotiv („YGSI“-Proteine, s. Kap. 2.1) besitzen, zusammengefasst. Wie auch in den vorherigen Kapiteln, wurden für alle identifizierten Genmodelle bioinformatische Analysen durchgeführt, um Vorhersagen über N-terminale Zielsteuerungssequenzen, putative Transmembrandomänen und konservierte Proteindomäne zu treffen.

Insgesamt wurden vier Proteine (48159, 35296, 43134, 47346) identifiziert, die eine MATE-Domäne besitzen und eine Sequenzähnlichkeit zu den MATE-Transportern AT3G59030 und AT3G26590 aus

A. thaliana zeigten (Tab. 6). MATE-Transporter sind ubiquitär in Prokaryoten und Eukaryoten zu finden und variieren je nach Organismus in ihrer Funktion. So fungieren bakterielle MATE-Transporter als *multidrug*-Transporter für organische Kationen (wie beispielsweise Ethidiumbromid oder Acriflavin) und extrudieren solche aus der Zelle (Omote et al. 2006). Des Weiteren konnten bereits im Zuge der Bachelorarbeit von Oliver Bäcker (2016) vier Untereinheiten eines *vacuolar transport chaperons* (VTC1-VTC4) identifiziert werden, die in anderen Organismen sowohl für die Polyphosphatsynthese als auch für die Fusion von Vakuolen bekannt sind (Muller et al. 2002; Lander et al. 2016).

Die identifizierten MATE-Transporter besitzen jeweils keine vorhergesagte N-terminale Zielsteuerungssequenz und laut TOPCONS zwischen zehn und 14 Transmembrandomänen. Die Genmodelle von *mate1*, *mate2* und *mate3* konnten mittels EST-Daten mit anschließender Amplifizierung aus cDNA verifiziert werden. Das Genmodell für *mate4* konnte nicht über EST-Daten vollständig abgedeckt werden, wodurch sämtliche Introns nicht bestätigt werden konnten. Die Amplifizierung der codierenden Sequenz von MATE4 sowohl auf cDNA als auch auf gDNA blieb erfolglos, so dass *in vivo* Lokalisationsstudien für MATE4 nicht durchgeführt werden konnten. VTC2 konnte bereits von Oliver Bäcker *in vivo* als eGFP-Fusionsprotein lokalisiert werden (Bäcker 2016).

Tabelle 6: Identifizierte MATE-Proteine aus *P. tricornutum*

Pt. ID (filtered model), Name	At. Homolog, e-Wert	Konservierte Proteindomäne	Anmerkung	Lokalisation
48159, MATE1	AT3G59030 3e-20	MATE_eukaryotic		V
35296, MATE2	AT3G59030 8e-17	MATE_eukayotic		V (?)
43134, MATE3	AT3G26590 7e-7	MATE_eukayotic		n.d.
47346, MATE4	AT3G26590 1e-13	MATE_eukayotic	Kein Amplifikat	n.d.
35739, VTC2		DUF202	von Oliver Bäcker zur Verfügung gestellt	V

Aufgelistet sind die identifizierten MATE-Transporter und VTC2 von *P. tricornutum* mit ihren jeweiligen Protein IDs und ihren Namen sowie konservierte Proteindomänen. Die Protein IDs stammen aus der *P. tricornutum* bzw. der *A. thaliana*-Datenbank. MATE= *multidrug and toxic extrusion compartment*; VTC= *vacuolar transport chaperon*; V= Vakuole; n.d.= nicht determiniert.

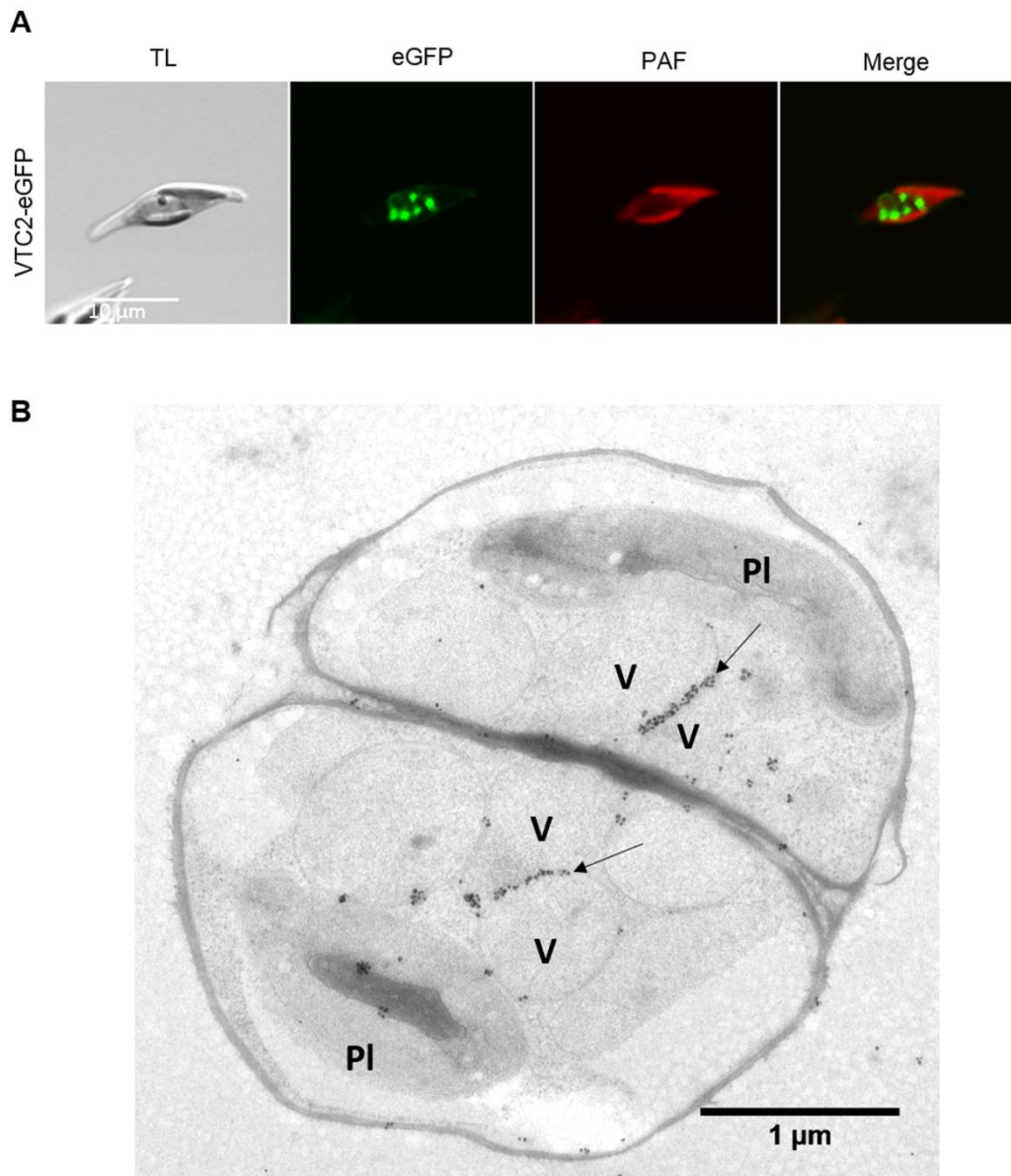


Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisation von VTC2. (A) Die Expression von VTC2-eGFP resultierte in mehreren, punktförmigen Fluoreszenzen nahe des Nukleus sowie einer schwächeren eGFP-Fluoreszenz am Rand der Zelle. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= Plastidenautofluoreszenz; Merge = Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab= 10 µm (B) transmissionselektronische Aufnahme nach Immunogold-Markierung von VTC2-eGFP. Die Pfeile zeigen die Immunogold-Markierung von VTC2-eGFP, die an Regionen detektiert werden konnte, wo zwei Vakuolenmembranen miteinander in Kontakt treten. VTC2-eGFP wurde mithilfe des Nitratreduktase-Promotors exprimiert. V=Vakuole; PI= Plastid. (Abbildung aus Schreiber et al. 2017).

Die *in vivo* Lokalisation des eGFP-Fusionsproteins von VTC2 wurde erneut in dieser Arbeit dargestellt (Abb. 10A). Das Fusionsprotein VTC2-eGFP zeigt nicht wie erwartet ein Fluoreszenzmuster, das einer Lokalisation in der Vakuolenmembran entspricht, sondern zeigt mehrere punktförmige Strukturen in der Nähe des Nukleus sowie eine schwächere Fluoreszenz am Rand der Zelle. Zur weiteren Untersuchung dieser Lokalisation wurden ultradünne Zellschnitte mit Immunogold markiert und mittels eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) erneut analysiert (Abb. 10B). Die Immunogold-Markierung konnte an den Regionen detektiert werden, in

denen zwei vakuoläre Membranen in Kontakt treten, was das Fluoreszenzmuster von VTC2-eGFP erklärt.

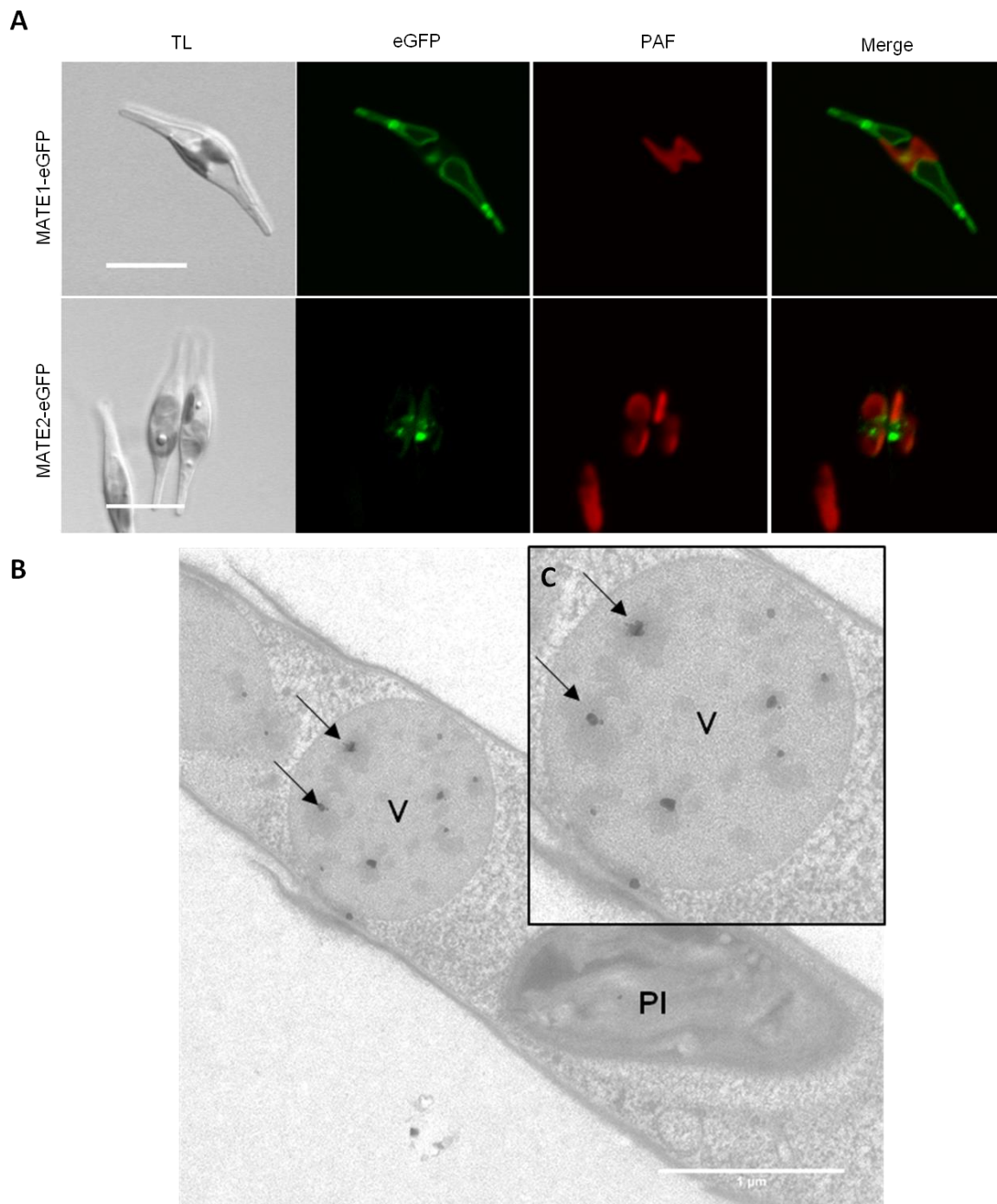


Abbildung 11: Subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine MATE1-eGFP und MATE2-eGFP. (A) MATE1-eGFP zeigt eine typische Lokalisation in der Membran der zentralen Vakuole von *P. tricornutum*, MATE2-eGFP hingegen zeigt mehrere, punktförmige Fluoreszenzstrukturen. TL= transmitted light; eGFP= enhanced green fluorescent protein; PAF= Plastidenautofluoreszenz; Merge= Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab= 10 µm. (B) Immunogold-Markierung von MATE2-eGFP, detektiert mittels TEM. Die Pfeile zeigen die Immunogold-Markierung von MATE2-eGFP, das im Lumen der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* detektiert wurde. (C) Vergrößerter Ausschnitt aus (B). V= Vakuole; PI= Plastide. Maßstab 1 µm. Die Fusionsproteine wurden mithilfe des Nitratreduktase-Promotors exprimiert (TEM-Aufnahme von Thomas Heimerl).

MATE1-eGFP zeigt eine Lokalisation in der Vakuolenmembran von *P. tricornutum* (Abb. 11A). Da für MATE2-eGFP wie VTC2-eGFP mehrere, punktartige sowie eine leichte eGFP-Fluoreszenz am Rand der Zelle detektiert wurde, wurde hier ebenfalls eine Immunogold-Markierung an ultradünnen Zellschnitten durchgeführt und mittels TEM detektiert. Die Immunogold-Markierung konnte in Clustern im Lumen der zentralen Vakuole detektiert werden (Abb. 11B). Um den Immunogold-markierten Bereich ist des Weiteren ein dunkler Schatten zu erkennen, der aufgrund einer höheren Elektronendichte zustande kommt. Da MATE2 laut der Transmembrandomänenvorhersage zehn Transmembrandomänen besitzt, ist es fraglich, ob die Immunogold-Markierung ein aussagekräftiges Ergebnis darstellt. Zur Überprüfung der Membranständigkeit von MATE2 wurde eine Carbonatextraktion durchgeführt, die weder ein eindeutiges Ergebnis über die Membranständigkeit zeigte noch konnte eine Aussage über den Degradationszustand des Fusionsproteins getroffen werden.

2.2.3.1 Identifizierung und Lokalisierung der „YGS1“-Proteine

Für bioinformatische Analysen wurden aus dem Datensatz der YGS1-Proteine die Proteine 47060, 44950 und 45961 (s. Tab. 2) ausgewählt. Die *conserved domain search* ergab für 44950 eine MFS-Proteindomäne, 47060 besitzt eine Abhydrolase *superfamily*-Domäne und wurde in der Genomdatenbank von *P. tricornutum* als Esterase/Peptidase annotiert (Abb. 12). Das Protein 45961 besitzt eine *trypsin-like superfamily*-Domäne und besitzt im Gegensatz zu 47060 und 44950 eine vorhergesagte N-terminale Zielsteuerungssequenz. Das putative Targetingmotiv „YGS1“ wurde für 47060 und 44950 jeweils in einem vorhergesagten cytoplasmatischen Bereich des N-Terminus, für 45961 wurde dieses am C-Terminus detektiert.

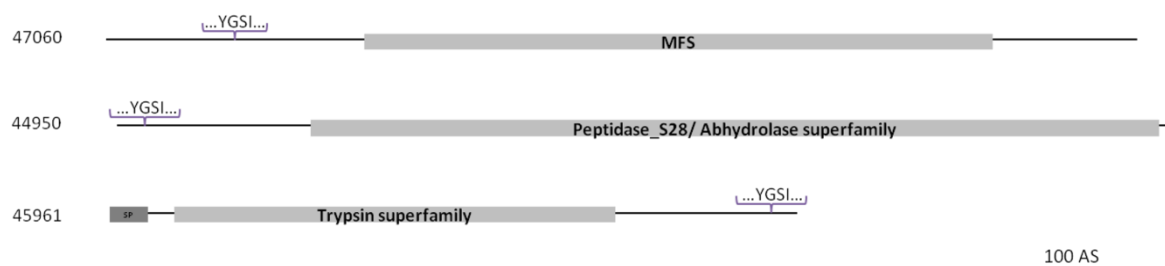


Abbildung 12: Schematische Darstellungen der Proteindomänen untersuchter YGS1-Proteine. Gezeigt sind die Proteine 47060, 44950 und 45961. Das putative Targetingmotiv „YGS1“ ist jeweils mit einer Klammer gezeigt. MFS= *major facilitator superfamily*, SP= Signalpeptid.

In vivo Lokalisationsstudien der an eGFP fusionierten AS-Sequenz der identifizierten YGS1-Proteine ergaben für die Fusionskonstrukte 47060-eGFP und 44950-eGFP eine ähnliche Lokalisation, die möglicherweise im ER und in der Plasmamembran detektiert wurde. 45961-eGFP zeigt eine für die Vakuolenmembran typische Lokalisationsstruktur (Abb. 13).

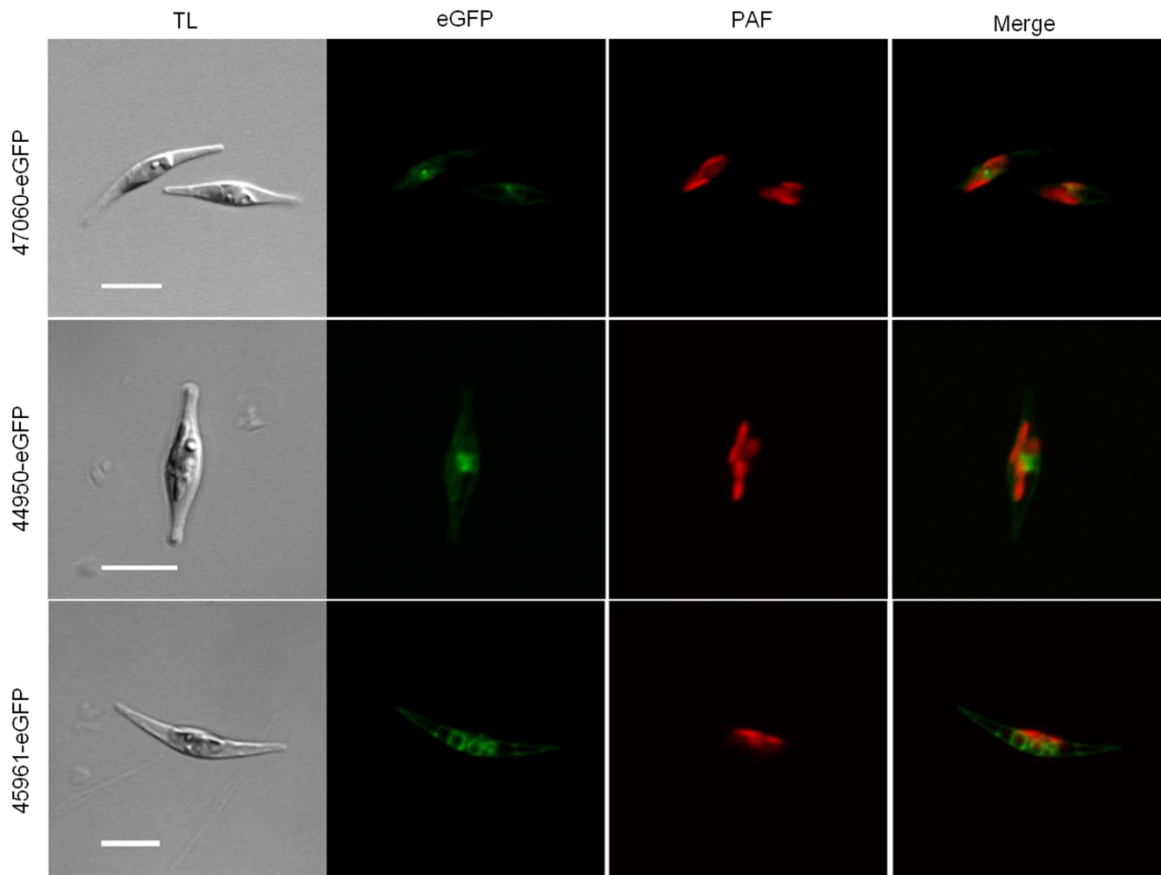


Abbildung 13: In vivo Lokalisation von 47060, 44950 und 45961. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte über den Nitratreduktase-Promotor. 47060-eGFP und 44950-eGFP zeigen eine mögliche Lokalisation im ER und in der Plasmamembran. Die Expression des Fusionsproteins 45961-eGFP resultierte in einer Vakuolenmembran-typischen Lokalisationsstruktur. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge = Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab= 10 µm.

2.2.4 Peptidasen und Hydrolasen

Weitere *in vivo* Lokalisationsstudien beschäftigten sich mit löslichen Proteinen, die im Lumen der Vakuole lokalisiert sein könnten. Aus dem Datensatz des gezielten Screenings der *P. tricornutum* Genomdatenbank wurden fünf Genmodelle (50463, 49793, 26742, 35668, 50531) auf ihre Vollständigkeit mittels EST-Daten untersucht und ebenfalls bioinformatisch analysiert (Tab. 7). Anhand der konservierten Domänen wurden die identifizierten Proteine in die Klasse der Peptidasen und Hydrolasen eingegliedert. Eine zu den Hydrolasen gehörende Enzymklasse sind Glykosidasen, deren Vorkommen in vielen Organismen weit verbreitet ist und die je nach Substrat verschiedene Aufgaben im Abbau von Glykolipiden in Mammalia oder beim Recycling von Oligosacchariden der Zellwand in Pflanzen übernehmen (Ketudat Cairns et al. 2015, 2015; Ketudat Cairns und Esen 2010). In Diatomeen sind Glykosidasen möglicherweise am Karbohyratmetabolismus beteiligt (Kroth et al. 2008).

Tabelle 7: *In silico* untersuchte Glykosidasen aus *P. tricornutum*

Pt. ID (filtered model ID), Name	At. Homolog, e-Wert	Konservierte Proteindomäne	Anmerkung	Lokalisation
50463, Peptidase1	AT4G36195 2.E-31	Peptidase_S28	Signalpeptid	ER? V?
49793, β -Glyc1	AT5G10560 3.E-67	Glyco_hydro_3 superfamily		V
26742,45128, β -Glyc2	AT5G10560 6.E-75	Glyco_hydro_3 superfamily		n.d.
35668, β -Glyc3	AT5G10560 2.E-86	Glyco_hydro_3 superfamily	Signalpeptid	n.d.
50351 β -Glyc4	AT5G33790 3.E-134	Glyco_hydro_1 superfamily	Signalanker	n.d.

In der Tabelle wurden die Glykosidasen aufgelistet, die *in silico* mittels diverser bioinformatischen Tools analysiert wurden. Die Protein IDs stammen aus der *P. tricornutum* bzw. der *A. thaliana*-Datenbank. Pt= *Phaeodactylum tricornutum*; At= *Arabidopsis thaliana*; Glyco_hydro= Glycosyl hydrolase; ER= Endoplasmatisches Retikulum; V= Vakuole; n.d.= nicht determiniert.

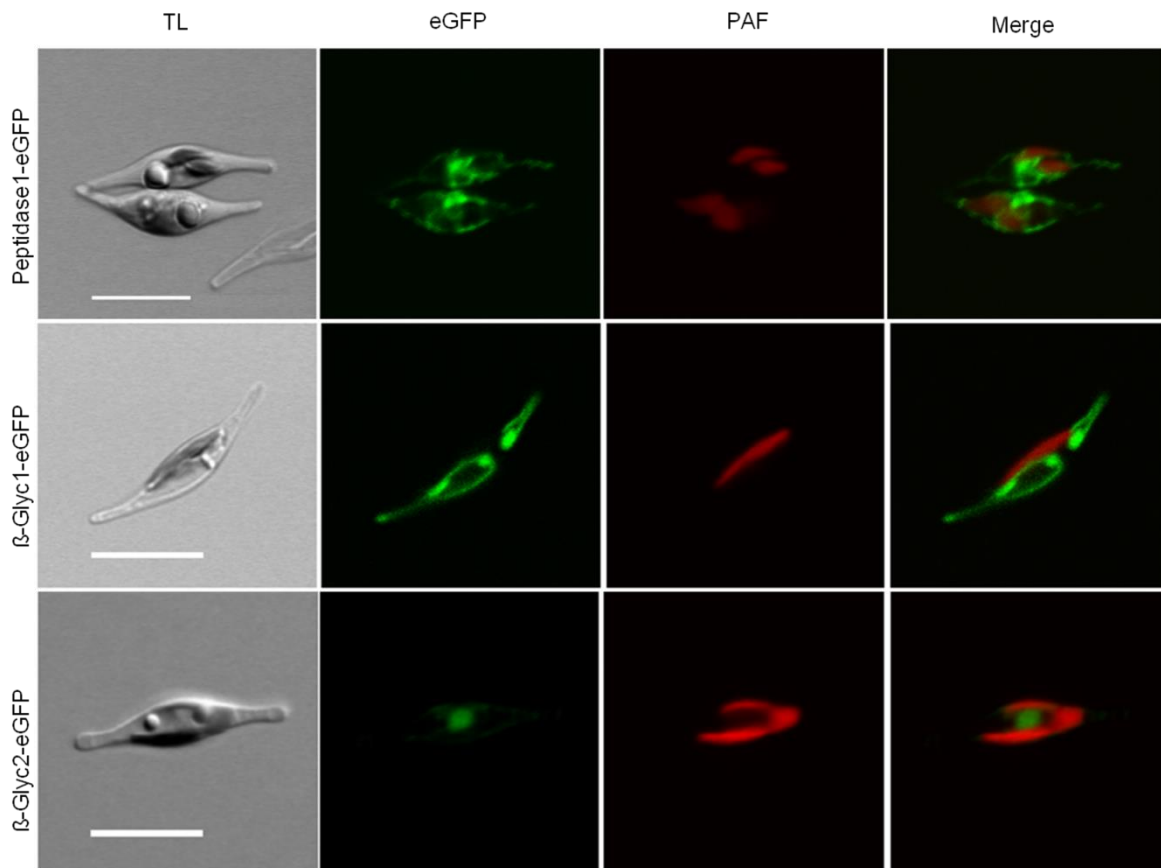


Abbildung 14: Subzelluläre Lokalisation der identifizierten Glykosidasen mithilfe von eGFP-Fusionsproteinen. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte über den Nitratreduktase–Promotor. β -Glyc1-eGFP zeigt ein Vakuolenmembran-Fluoreszenzmuster, während Peptidase1-eGFP ein ER-ähnliches Fluoreszenzmuster aufweist. Die Expression von β -Glyc2-eGFP resultierte in einem unspezifischen Fluoreszenzmuster. TL= transmitted light; eGFP= enhanced green fluorescent protein; PAF= Plastidenautofluoreszenz; Merge = Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab = 10 μ m. (Abbildung von Peptidase1-eGFP aus Puzik 2016)

Die *in vivo* Lokalisationsstudien ergaben drei verschiedene Lokalisationen der identifizierten Glykosidasen sowie der Peptidase1 (Abb. 14). Das Fusionsprotein von Peptidase1 zeigte ein Fluoreszenzmuster, welches sich in der Mitte der Zelle konzentriert und ausgehend aus diesem

Punkt sich netzartig über die gesamte Zelle verteilt, wodurch eine Lokalisation in der ER-Membran vermutet werden kann. Die Fluoreszenz von β -Glyc2-eGFP erstreckt sich innerhalb einer zentralen, punktartigen Struktur in der Mitte sowie einer schwächeren Fluoreszenz am Rand der Zelle. Die subzelluläre Lokalisation von β -Glyc1-eGFP hingegen resultierte in einem charakteristischen Vakuolenmembran-Fluoreszenzmuster.

Die Fusionsproteine Peptidase1-eGFP und β -GLYC2-eGFP wurden zur weiteren Untersuchung hinsichtlich ihrer Lokalisationen mittels eines TEM erneut analysiert (Abb. 15). Die Immunogold-Markierung der Fusionsproteine Peptidase1-eGFP und β -GLYC2-eGFP zeigten eine Lokalisation im Lumen der zentralen Vakuole. Während Peptidase1-eGFP im Lumen verteilt detektiert werden konnte, liegt β -GLYC2-eGFP innerhalb der Vakuole in Clustern vor.

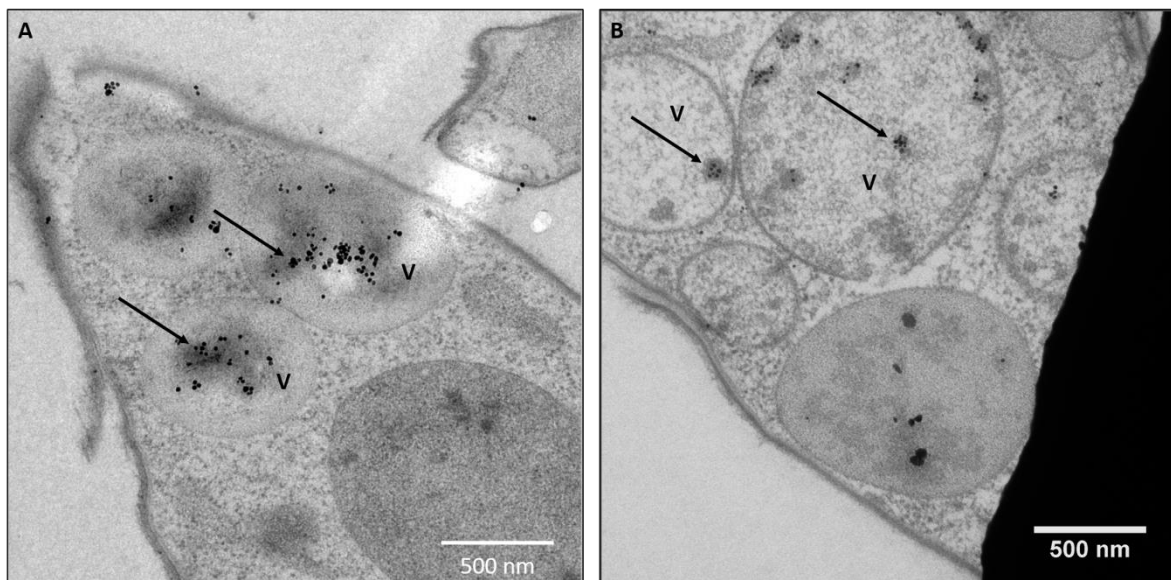


Abbildung 15: Immunogold-Markierung von (A) Peptidase1-eGFP und (B) β -GLYC2-eGFP detektiert mittels TEM. Die Pfeile zeigen die Immunogold-Markierungen, die im Lumen der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* detektiert wurden. (Abbildung der Immunogold-Markierung der Peptidase1-eGFP aus der Puzik 2016; TEM-Aufnahmen von Thomas Heimerl).

2.2.4.1 Analyse der Membranintegration putativer Peptidasen und Hydrolasen

Da β -Glyc1-eGFP eine Lokalisation in der Membran der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* zeigte, wurden für die lokalisierten Proteine (Peptidase1, β -Glyc1 und 2) mehrere bioanalytische Vorhersagen hinsichtlich ihrer Transmembrandomänen durchgeführt, um eine falsche Vorhersage der Transmembrandomänen zu minimieren (s. Anhang Tab. 30). Das Ergebnis dieser Analysen war, dass eine Mehrheit der Vorhersagetools für β -Glyc1 und Peptidase1 eine bis drei Transmembrandomänen detektierten, während für β -Glyc2 eine Mehrheit dieser Tools keine Transmembrandomänen vorhersagten. Um eine Membranintegrität dieser Proteine experimentell zu untersuchen, wurde eine Carbonatextraktion durchgeführt (Abb. 16). Der Western Blot mit anschließender Immunodetektion (s. Kap. 5.2.22 und 5.2.23) zeigte für Peptidase1-eGFP ein sehr

starkes Signal in der löslichen Fraktion, ein schwächeres Signal ist zusätzlich in der integralen Fraktion mittels GFP-Antikörper detektiert worden. Ein ähnliches Ergebnis wurde für β -Glyc1-eGFP erzielt. Verglichen mit der Kontrolle für die integrale Fraktion, ein integrales Protein des Photosystems II in der Thylakoidmembran, konnte zusätzlich in der löslichen Proteinfraction ein Signal mittels α -PsbD detektiert werden. Die Kontrolle für lösliche Proteine, die große Untereinheit von Rubisco RbcL, war nur in der löslichen Proteinfraction detektierbar. Die errechnete molekulare Masse von β -Glyc2 zusammen mit eGFP betrug ca. 120 kDa. Ein Signal wurde weit unter 130 kDa detektiert. Neben der detektierten Bande bei ca. 170 kDa in der löslichen Proteinfraction, wurden zusätzlich weitere Proteinbanden bei ca. 30 kDa und 40 kDa detektiert. Die Kontrolle für die lösliche Fraktion konnte in der erwarteten Proteinfractionen detektiert werden. Eine Detektion der Kontrolle für die integrale Fraktion blieb jedoch erfolglos. Trotz gleicher Verhältnisse der Proteinkonzentrationen, sind die Kontrollproteine wesentlich schwächer exprimiert als das Fusionsprotein.

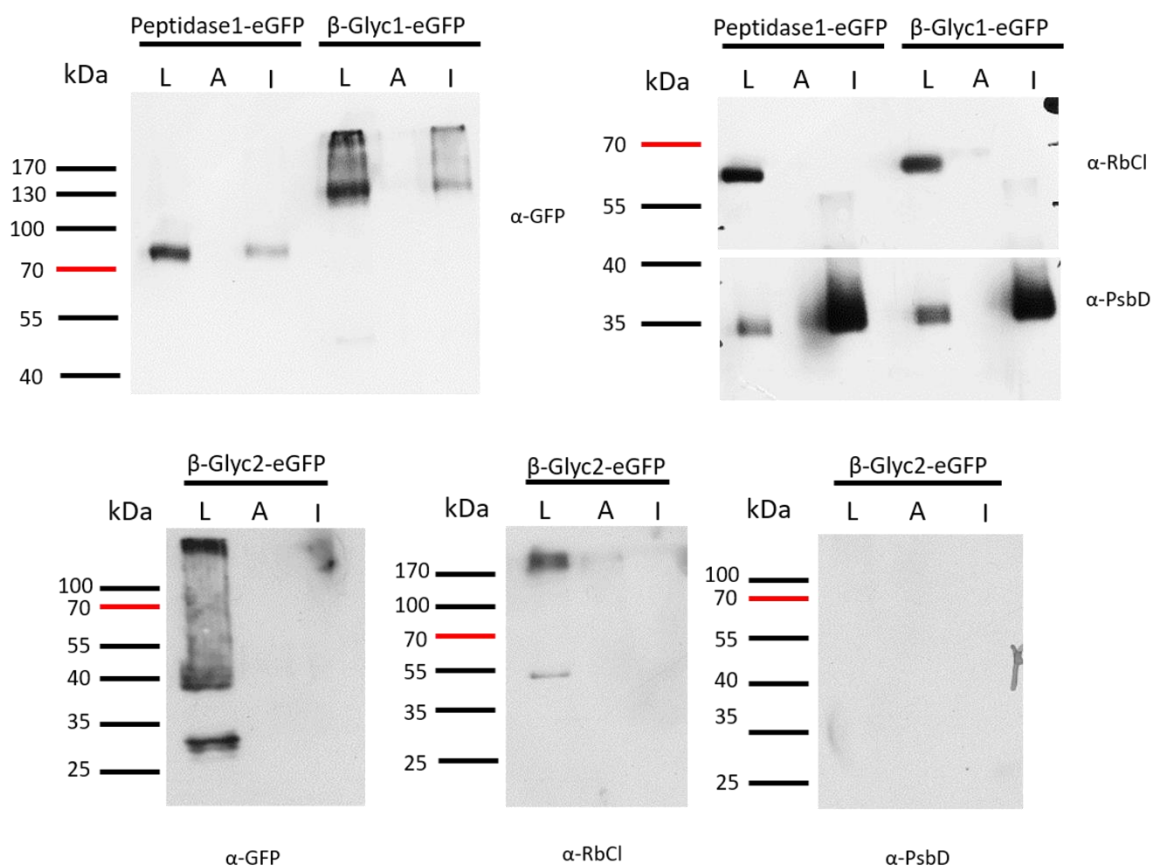


Abbildung 16: Western Blot nach Carbonatextraktion mit den lokalisierten Hydrolasen und Peptidasen. Ausgehend von der Proteinkonzentration der Integralen Fraktion (5 μ g) wurden für alle Fraktionen gleiche Volumina aufgetragen. Die Detektion der eGFP-Fusionsproteine erfolgte mittels GFP-Antikörper (1:3.000). Als Kontrolle für die lösliche Fraktion diente der Antikörper gegen die große Untereinheit von Rubisco (α -RbCl, 1:7.500), für die Integrale Kontrolle wurde der Antikörper gegen eine Untereinheit des Photosystems II (α -PsbD, 1:7.500) verwendet. L= lösliche Fraktion; A= assoziierte Fraktion, I= integrale Fraktion. Berechnete molekulare Massen der Fusionsproteine: Peptidase1-eGFP= ca.80 kDa; β -Glyc1-eGFP= ca. 120 kDa; β -Glyc2-eGFP ca. 130 kDa (Western Blot von Peptidase1-eGFP und β -Glyc1-eGFP aus Puzik 2016).

2.3 Untersuchung des Proteintransportes von vakuolären Membranproteinen

Durch *in silico* Analysen mit darauf folgender Identifizierung und Lokalisation putativer Vakuolenproteine, konnten insgesamt sieben Proteine zuzüglich der bereits in vorherigen Arbeiten lokalisierten Proteine (CBS, ABC3 und TIP1) eindeutig als vakuoläre Membranproteine bestätigt werden (Tab. 8). In einigen eukaryotischen Organismen ist der Transport von vakuolären/lysosomalen Proteinen bereits untersucht und verschiedene Targetingmotive identifiziert worden (zusammengefasst in Marcos Lousa und Denecke 2016). Da in *P. tricornutum* bis dato über das vakuoläre Proteintargeting nichts weiter bekannt ist, wurde der Proteintransport der membranständigen Vakuolenproteine im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht.

Tabelle 8: Lokalisierte Vakuolenmembranproteine in *P. tricornutum*

Protein ID	Name	SP (+/-)	Anzahl TMD	Konservierte Proteindomänen	Putative Tyrosinmotive	Putative Dileucinmotive
47599	CBS	+	4	CorC-Hylc	5	9
19556	ABC3*	(+)		ATM1	10	6
BD1370	TIP1*	-	6	MIP	3	1
35739	VTC2	-	3	DUF		
30620	VCT3	-	12	MFS-1, AraJ, XylE	1	1
46251	VCT6	-	12	MFS-1, AraJ, Synapt_SV2	2	1
23557	CAT1	-		Cat-Efflux; Zinc_transporter	2	0
43530	TPK2	-		Ion_trans; EFh	3	0
45961		+	1	Tryp_SPd domain	1	0
48159	MATE1	-	10	MATE_eukaryotiv	3	2
49793	β-GLYC1	-	1-3	Glyco_hydro_3 superfamily	10	6
50238	TGS1#	+	1		9	2
56509	TGS2#	+	1		4	0

Angegeben wurden die Protein IDs der vakuolären Membranproteine sowie die Ergebnisse der *in silico* Analysen in Bezug auf Signalpeptide (SP), Transmembrandomänen (TMD), konservierte Proteindomänen, potentielle Tyrosin- und Dileucinmotive. + = Signalpeptid vorhergesagt; - = kein Signalpeptid vorhanden; * = publiziert in Liu et al 2016; # = publiziert in Huang et al 2016.

2.3.1 Brefeldin A und Wortmannin

Zur Untersuchung des vesikulären Proteintransports können verschiedene Inhibitoren verwendet werden, die womöglich den Transport der zu untersuchenden Proteine blockieren. Einer der bekanntesten Inhibitoren ist Brefeldin A (BFA), ein Toxin aus *Alternaria carthami*. BFA inhibiert die ARF1-GTPase, so dass das Abschnüren von Vesikeln des Golgi-Apparates beeinträchtigt wird (Donaldson et al. 1992b). Diese Beeinträchtigung führt zum Erliegen des COP-Vesikeltransportes, wodurch der Golgi-Apparat kollabiert und Cargo-Proteine im ER akkumulieren. Ein weiterer Inhibitor zur Untersuchung der verschiedenen Proteintransportwege ist Wortmannin, ein Metabolit aus *Penicillium funiculosum*. Wortmannin inhibiert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und blockiert somit das Protein-Recycling von *prevacuolar compartments* (PVC) bzw. *multi vesicular bodies* (MVB) zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), wodurch das TGN anschwellt (Wang et al. 2009).

Der Transport von VCT3, CBS, ABC3 und TIP1 wurde mithilfe von Brefeldin A und Wortmannin untersucht. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass CBS aufgrund seiner N-terminalen Zielsteuerungssequenz über den sekretorischen Weg zur Vakuolenmembran transportiert wird, während TIP1, äquivalent zu seinem Ortholog aus *A. thaliana*, den Golgi-unabhängigen Weg benutzt, um zur Vakuolenmembran zu gelangen. Laut dieser Hypothese sollte bei einer BFA-Behandlung das eGFP-Fusionsprotein von CBS im ER akkumulieren, während BFA keinen Effekt auf die Lokalisation von TIP1-eGFP haben sollte. Der Versuch wurde wie in Kilian und Kroth beschrieben durchgeführt (Kilian und Kroth 2005). Allerdings konnte sowohl für CBS als auch für die anderen Proteine für beide Inhibitoren trotz Variationen in der Inhibitorkonzentration als auch in der Induktionszeit der Fusionsproteine kein Effekt auf die Lokalisation beobachtet werden (s. Anhang Abb. 43-47).

2.3.2 Identifizierung und Verifizierung putativer Tyrosin- und Dileucin Targetingmotiven

Um verschiedene Targetingmotive zu identifizieren, wurden mehrere Versuchsansätze durchgeführt. Zur ersten Analyse wurden eGFP-Fusionskonstrukte generiert, bei denen entweder der N- oder C-Terminus der untersuchten Proteine deletiert wurde, um N-terminale Zielsteuerungssequenzen bzw. potentielle Targetingmotive zu identifizieren (s. Kap. 2.3.2.1). Bei einer Veränderung in der Lokalisation der modifizierten Fusionsproteine wurden Aminosäureaustauschmutanten generiert, um potentielle Targetingmotive zu verifizieren.

Ein weiterer Versuchsansatz basierte auf *in silico* Analysen mittels *eukaryotic linear motif resource* (ELM), die eine Identifizierung von potentiellen Targetingmotiven erleichterte (s. Kap. 2.3.2.3). Des Weiteren wurden Aminosäuresequenzen von *A. thaliana* und *P. tricornutum* verglichen, um ggf. konservierte Targetingmotive, die bereits in Proteinen von *A. thaliana* verifiziert werden konnten, in den orthologen Proteinen von *P. tricornutum* zu identifizieren (s. Kap. 2.3.2.2). Potentielle Targetingmotive der untersuchten vakuolären Membranproteine wurden durch Austausch der für das Targetingmotiv essentiellen Aminosäuren modifiziert und mittels *in vivo* Lokalisationsstudien analysiert.

Im Folgenden werden die verschiedenen Versuchsansätze für die vakuolären Membranproteine CBS, ABC3, TIP1, TPK2, 45961 und VCT3 ausführlich betrachtet.

2.3.2.1 Untersuchung der N-terminalen Zielsteuerungssequenz von CBS und ABC3

Die ersten Analysen hinsichtlich vakuolären Targetingsignalen beschränkten sich auf die bereits bekannten Membranproteine CBS (von Simone Stork zur Verfügung gestellt), ABC3 und TIP1 (Liu et al. 2016). CBS besitzt eine N-terminale Zielsteuerungssequenz, die Vorhersage für ein Signalpeptid war für ABC3 ebenfalls positiv, jedoch mit einer geringen Wahrscheinlichkeit. Für TIP1 wurde kein

N-terminales Signalpeptid vorhergesagt (s. Tab. 8). Um die Relevanz dieser Zielsteuerungssequenzen in Bezug auf den Proteintransport zu überprüfen, wurden Fusionsproteine generiert, in denen das putative Signalpeptid jeweils deletiert wurde (Abb. 17). Das verkürzte Fusionsprotein CBS Δ_{SP} -eGFP wurde nicht in die Vakuolenmembran dirigiert, während ABC3 Δ_{SP} -eGFP keine veränderte Lokalisation zeigt. Im Fall von ABC3 ist das Signalpeptid für den Transport hingegen irrelevant. Wird der N-Terminus jedoch noch weiter verkürzt (AS1-121), veränderte sich die Lokalisation des Fusionsproteins so, dass eine Fluoreszenz in der Plasmamembran detektiert werden konnte.

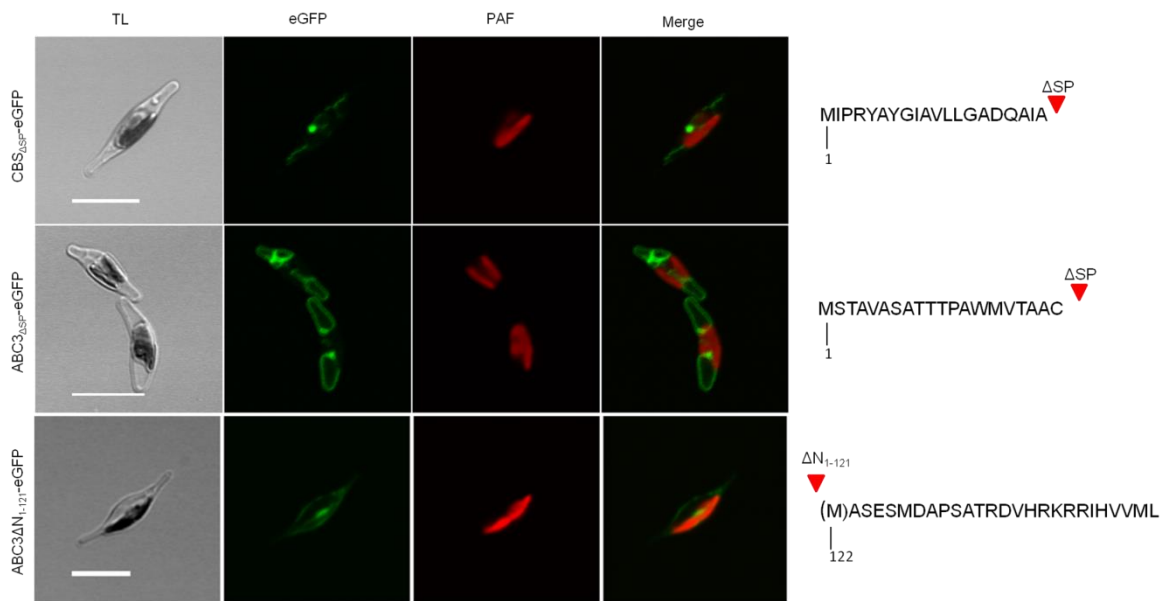


Abbildung 17: Subzelluläre Lokalisation von CBS Δ_{SP} -eGFP, ABC3 Δ_{SP} -eGFP und ABC3 Δ_{N1-121} -eGFP. Gezeigt sind die Fusionsproteine von CBS und ABC3, bei denen die vorhergesagten Signalpeptide (CBS Δ_{SP} und ABC3 Δ_{SP}) und die Aminosäuren 1-121 des N-Terminus von ABC3 Δ_{N1-121} deletiert wurden. CBS Δ_{SP} -eGFP lokalisierte nicht mehr in der Vakuole, ABC3-eGFP zeigte weiterhin eine Lokalisation in der Vakuolenmembran. Eine weitere Verkürzung des N-Terminus von ABC3 zeigte eine Lokalisation in der Plasmamembran. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge = Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab= 10 μ m. (Abbildungen von CBS Δ_{SP} -eGFP und ABC3 Δ_{SP} -eGFP aus Schreiber et al. 2017).

2.3.2.2 Identifizierung putativer Targetingmotive für ABC3, TIP1 und CBS

Da das verkürzte Fusionsprotein von ABC3 eine Lokalisation in der Plasmamembran aufwies (s. Abb. 17), wurde der N-Terminus genauer untersucht und nach putativen Targetingsignalen gescreent. Beim Screening des N-Terminus konnten zwei mögliche Targetingmotive identifiziert werden. Bei diesen putativen Targetingsequenzen handelt es sich um ein Tyrosin- (YGSI) sowie ein Dileucinmotiv (EAQPLL) (Abb. 18A). Diese wurden so modifiziert, dass die für das *targeting* relevanten Aminosäuren, d.h. für das Tyrosinmotiv das Tyrosin und die sperrige Aminosäure an Position +4 dieses Motivs (Isoleucin) und für das Dileucinmotiv die saure Aminosäure an Position eins sowie die beiden Leucine, gegen Alanin ausgetauscht wurden. Beide modifizierten Fusionsproteine von ABC3 zeigten keine Veränderung in der Lokalisation, was darauf schließen

lässt, dass diese putativen Targetingsignale keine Aufgabe im Proteintransport übernehmen. Eine weitere bioanalytische Untersuchung der Aminosäuresequenz auf mögliche Targetingsignale ergab weitere potentielle Tyrosin- bzw. Dileucin-Targetingmotive. Da in anderen eukaryotischen Organismen solche Motive hauptsächlich im N-terminalen bzw. C-terminalen Bereich identifiziert worden sind (Geisler et al. 1998; Larisch et al. 2012; Wolfenstetter et al. 2012), wurde hier ebenfalls der C-Terminus von ABC3 auf mögliche Targetingmotive untersucht. In diesem Bereich wurde ebenfalls ein vorhergesagtes Dileucinmotiv (DQLL) identifiziert, das durch Austausch der relevanten Aminosäuren mittels *in vivo* Lokalisationsstudien analysiert wurde. Die Aminosäureaustauschmutante ABC3_D/A LL/AA-eGFP zeigt am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (KLSM) eine sehr schwache Fluoreszenz entlang der Vakuolenmembran. Eine wesentlich stärkere, undefinierte Fluoreszenzstruktur kann in der Mitte der Zelle detektiert werden, die sich netzartig in die Spitzen der Zelle ausbreitet (Abb. 18B).

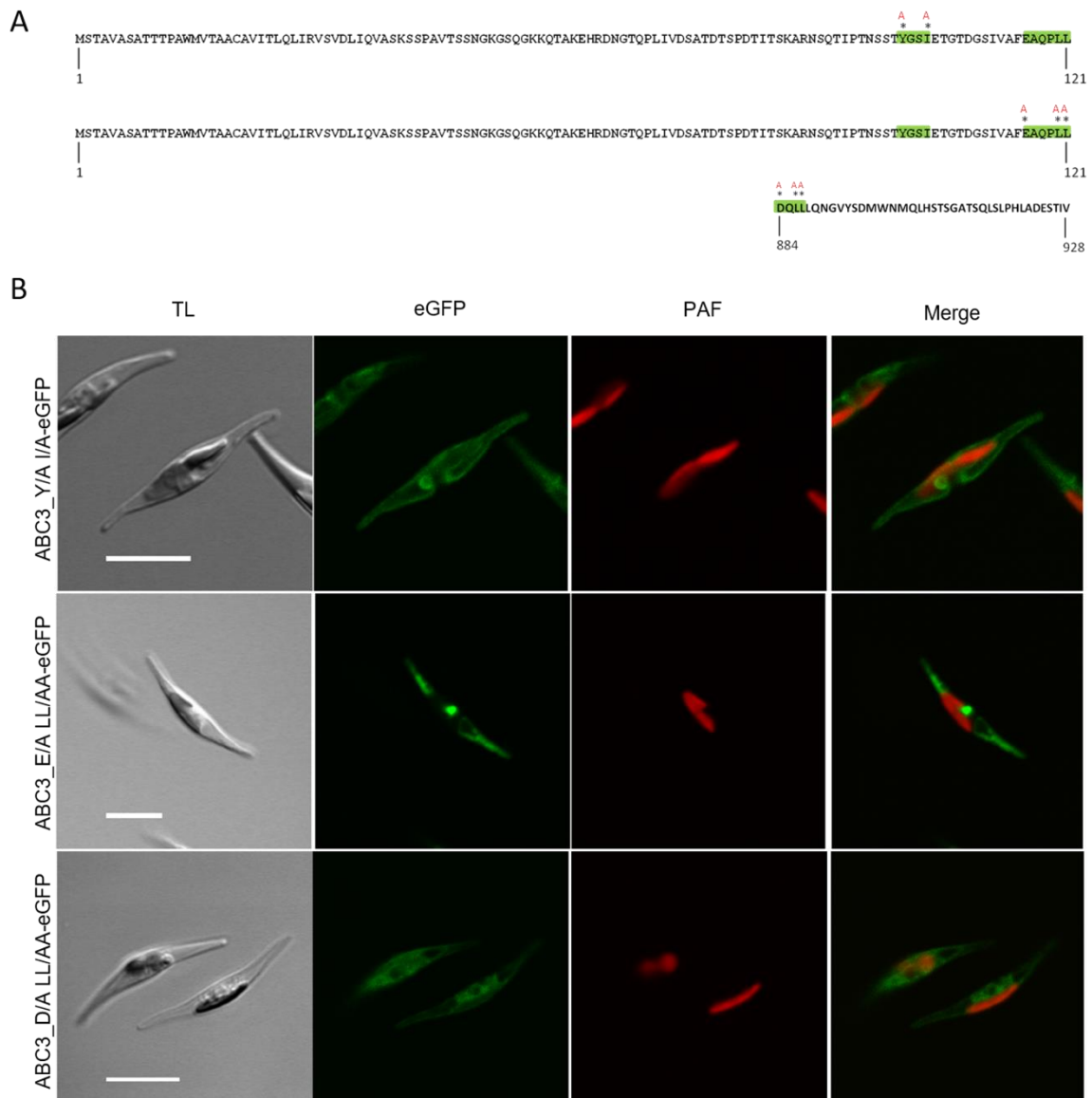


Abbildung 18: Subzelluläre Lokalisation der putativen, mutierten Targetingmotive von ABC3-eGFP. (A) Es wurden im N-terminalen und im C-terminalen Bereich putative Targetingmotive identifiziert, in Grün in der Aminosäuresequenz dargestellt. Der Austausch der für das *targeting* relevanten Aminosäuren ist in rot dargestellt. (B) Die Mutationen im N-terminalen Bereich (ABC3_Y/A I/A und ABC3_E/A LL/AA) hatten auf die Lokalisation in der Vakuolenmembran für ABC3 keinen Einfluss. Die Mutation des potentiellen Dileucinmotivs im C-terminalen Bereich führte ebenfalls zu einer leichten Fluoreszenz in der Vakuolenmembran (ABC3_D/A LL/AA). Zusätzlich zu dieser Lokalisation ließ sich eine Fluoreszenzstruktur in der Mitte der Zelle detektieren. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= Plastidenautofluoreszenz; Merge = Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab = 10 µm.

In der Aminosäuresequenz von CBS wurden mehrere potentielle Targetingmotive identifiziert, die auf Tyrosin- und Dileucinmotive basieren könnten. Eines dieser detektierten Motive, ist ein vorhergesagtes Dileucinmotiv (EGTPLL), das sich am C-Terminus von CBS befindet und im Weiteren analysiert wurde. Zur ersten Analyse wurde der C-Terminus von CBS so gekürzt, dass die letzten 23 Aminosäuren einschließlich des putativen Dileucinmotivs deletiert wurden (CBS Δ 23aa). Bei der Expression als Fusionsprotein, konnte für CBS Δ 23aa-eGFP eine Fluoreszenz in der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 19A), was darauf hindeutet, dass der C-terminale Bereich von CBS eine wesentliche Rolle in Bezug auf den Proteintransport zuteilwird.

Um zu überprüfen, ob das identifizierte Dileucinmotiv für ein korrektes *targeting* essentiell ist, wurden verschiedene Aminosäureaustauschmutanten generiert. Bei diesen Aminosäureaustauschmutanten wurde zum einen die saure Aminosäure (AGTPLL) oder nur die beiden Leucine (EGTPAA) und zum anderen alle für ein Dileucin-Motiv relevanten Aminosäuren (AGTPAA) gegen Alanin ausgetauscht (Abb. 19B). Die subzelluläre Lokalisation für CBS_E/A-eGFP resultierte in einer Fluoreszenzstruktur, die auf eine Lokalisation in der ER-Membran schließen lässt. Die Expression des Konstruktes *cbs_II/aa-egfp* hingegen zeigt eine Integration des Fusionsproteins in die Plasmamembran sowie eine punktuelle Struktur im Zentrum der Zelle. Dieselbe Beobachtung konnte bei dem Fusionsprotein CBS_E/A LL/AA-eGFP gemacht werden (Abb. 19A).

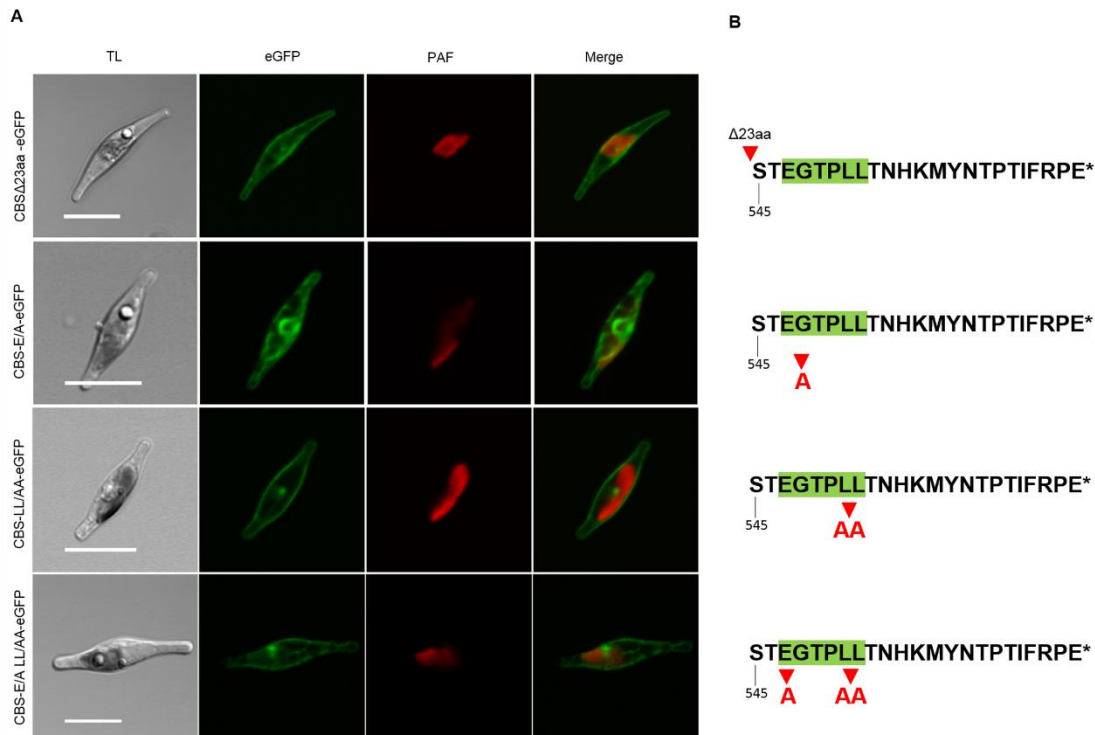


Abbildung 19: Lokalisation der CBS-Deletions- und Aminosäureaustauschmutanten. (A) Die Deletion der letzten 23 Aminosäuren des C-Terminus von CBS führten zu einer Lokalisation in der Plasmamembran. Das Mutieren des vorhergesagten C-terminalen Dileucinmotivs EGTPLL zeigte bei einer Expression als Fusionsproteins entweder eine Lokalisation in der Membran des ERs (CBS_E/A) oder eine Lokalisation in der Plasmamembran (CBS_LL/AA und CBS_E/A LL/AA). TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge = Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab = 10 μ m. (B) Aminosäuresequenzen des vorhergesagten Signalpeptids und des C-Terminus von CBS. Dileucinmotiv hervorgehoben in grün, Deletion und Mutationen sind in rot markiert. (Modifiziert aus Schreiber et al. 2017).

Zur Verifizierung des Dileucinmotivs EGTPLL wurde der C-Terminus von CBS an die codierende Sequenz der Proteine PIP1 und PDZ2, die in der Plasmamembran von *P. tricornutum* lokalisiert wurden (Liu et al. 2016) C-terminal fusioniert (Abb. 20B). PDZ2 besitzt ein Signalpeptid und eine Transmembrandomäne, für PIP1 wurde kein klassisches Signalpeptid detektiert und sechs Transmembrandomänen vorhergesagt. Es weist eine Sequenzähnlichkeit zu *membrane intrinsic proteins* (MIPs) auf. Über das Self-Assembling GFP System (SA-GFP), mit welchem die Topologie der Proteintermini bestimmt werden kann (Cabantous et al. 2005), wurden die C-Termini von PIP1 und PDZ2 untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl der C-Terminus von PDZ2 als auch der C-Terminus von PIP1 ins Cytosol ragen (s. Abb. 48). Die Chimära PDZ2-CT_{CBS} und PIP1-CT_{CBS}, fusioniert an eGFP, zeigten unterschiedliche Effekte in Bezug auf das intrazelluläre *targeting* (Abb. 20A). Während der C-Terminus von CBS in der Lage ist, PIP1 in die Vakuolenmembran zu dirigieren, wurde das Fusionsprotein PDZ2-CT_{CBS}-eGFP weiterhin in der Plasmamembran detektiert. Für eine weitere Chimära, zusammengesetzt aus dem Fragment PDZ2 (AS1-316), das die Transmembrandomäne weiterhin beinhaltet, und einem verlängerten Fragment des C-Terminus

von CBS (AS256-568), beginnend bei der letzten vorhergesagten Transmembrandomäne (Abb. 20B), wurde dieselbe Beobachtung gemacht.

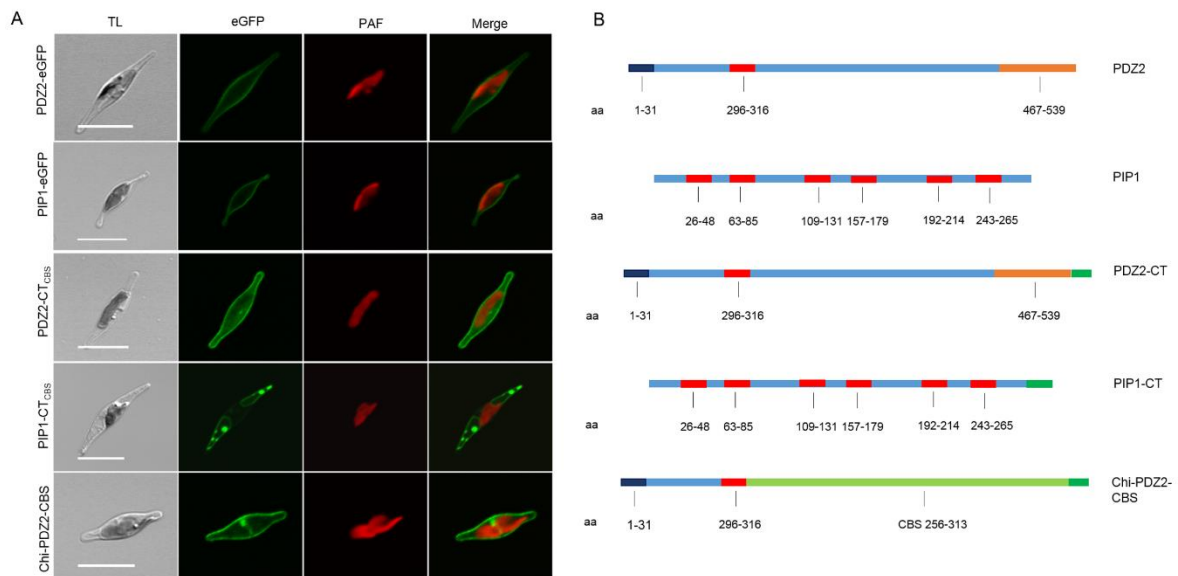


Abbildung 20: Subzelluläre Lokalisation der PIP1 und PDZ2 Varianten sowie ihre Sequenzen. (A) PDZ2-eGFP und PIP1-eGFP lokalisierten in der Plasmamembran. PIP1-CT_{CBS}, exprimiert als eGFP-Fusionsproteine, zeigte ein Fluoreszenzmuster, dass charakteristisch für eine Lokalisierung der Vakuolenmembran ist, während die Fusionsproteine der PDZ2-Chimära in der Plasmamembran detektiert wurden. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge= Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab= 10 µm. (B) Proteinarchitektur von PDZ2 und PIP1 und deren modifizierten Varianten. PDZ2 besitzt eine Transmembrandomäne von AS 296-316 (in rot markiert) und ein Signalpeptid (in dunkelblau gekennzeichnet). Eine PDZ-Proteindomäne ist in orange gezeigt. PIP1 besitzt sechs Transmembrandomänen (rot). Für die Chimära PIP1-CT_{CBS} und PDZ2-CT_{CBS} wurde der C-Terminus von CBS (grün) an die *full length*-Sequenz von PDZ2 und PIP1 C-terminal fusioniert. Für Chi-PDZ2-CBS wurde die codierende Sequenz von PDZ2 (in hellblau) einschließlich der vorhergesagten Transmembrandomäne (markiert in rot) an die Sequenz von CBS, die für die Aminosäuren 256-568 codieren (in grün), fusioniert. (Abbildung aus Schreiber et al. 2017).

Da für das Aquaporin TIP1 beim gezielten Screening der *P. tricornutum* Genomdatenbank ein Ortholog aus *A. thaliana* ermittelt wurde, wurde ein Alignment der Aminosäuresequenzen beider Proteine generiert, um ggf. eine identische bzw. konservierte Aminosäuresequenzabfolge zu identifizieren, die zum einen im cytoplasmatischen Bereichs des Proteins liegt und zum anderen womöglich ein putatives Targetingmotiv beinhaltet (Abb. 21). Der N-Terminus des TIP1 aus *P. tricornutum* ist im Gegensatz zu seinem Ortholog aus *A. thaliana* verlängert. In diesem verlängerten Abschnitt konnte ein Bereich festgestellt werden, der aus mehreren sauren Aminosäuren sowie Alanin (EEADAEE) besteht. Des Weiteren konnte ein mögliches Tyrosinmotiv detektiert werden (YGSI), das ebenfalls in der Aminosäuresequenz von ABC3 detektiert wurde. Höfte und Chrispeels zeigten anhand von Chimära, dass der C-terminale, cytoplasmatische Bereich von At α -TIP ausreicht, um ein nicht tonoplastidäres Protein zum Tonoplasten zu dirigieren (Höfte und Chrispeels 1992). Der C-Terminus des *P. tricornutum*-Proteins ist im Vergleich verkürzt. Da laut

TOPCONS der cytoplasmatische Bereich des C-Terminus nur aus vier Aminosäuren besteht, wurde dieser nicht weiter bei der Untersuchung eines möglichen Targetingmotivs berücksichtigt.

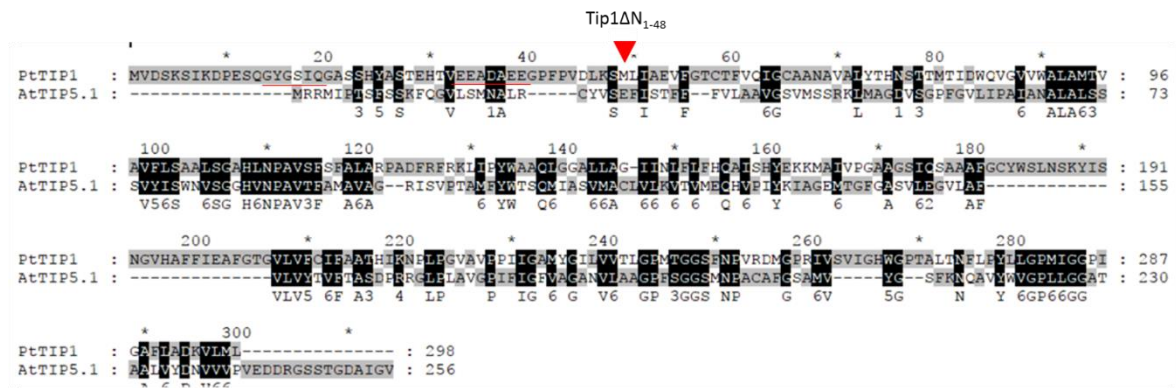


Abbildung 21: Proteinalignment von TIP1 aus *P. tricornutum* und dem Ortholog TIP5.1 aus *A. thaliana*. TIP1 besitzt im Vergleich zu seinem Ortholog TIP5.1 einen verlängerten N-Terminus, während der C-Terminus verkürzt ist. Eine verkürzte Version zur Analyse des N-Terminus (TIP1ΔN₁₋₄₈) ist in rot markiert.

Wie in den Analysen zuvor, wurde eine verkürzte Version von TIP1 generiert, in der der N-Terminus, AS1-48, deletiert wurde (TIP1ΔN₁₋₄₈, Abb. 22). TIP1ΔN₁₋₄₈, exprimiert als Fusionsprotein, zeigte eine starke punktartige Struktur sowie eine schwächere Fluoreszenz im Bereich des Nukleus und um die Plastide herum, die auf eine Lokalisation im cER hindeutet. Es wurden weitere Fusionskonstrukte generiert, in denen entweder das putative Tyrosinmotiv YGSI zu AGSA (TIP1_Y/A I/A) modifiziert wurde oder die sauren Aminosäuren im N-terminalen Bereich gegen Alanin ausgetauscht wurden (TIP1_exED/AA). Während der Austausch der sauren Aminosäuren keinen Effekt auf das *targeting* zur Vakuole hat, konnte für das Fusionsprotein TIP1_Y/A I/A-eGFP eine Fluoreszenzstruktur beobachtet werden, die möglicherweise einer Lokalisation in einem Teil des cERs entspricht (Abb. 22).

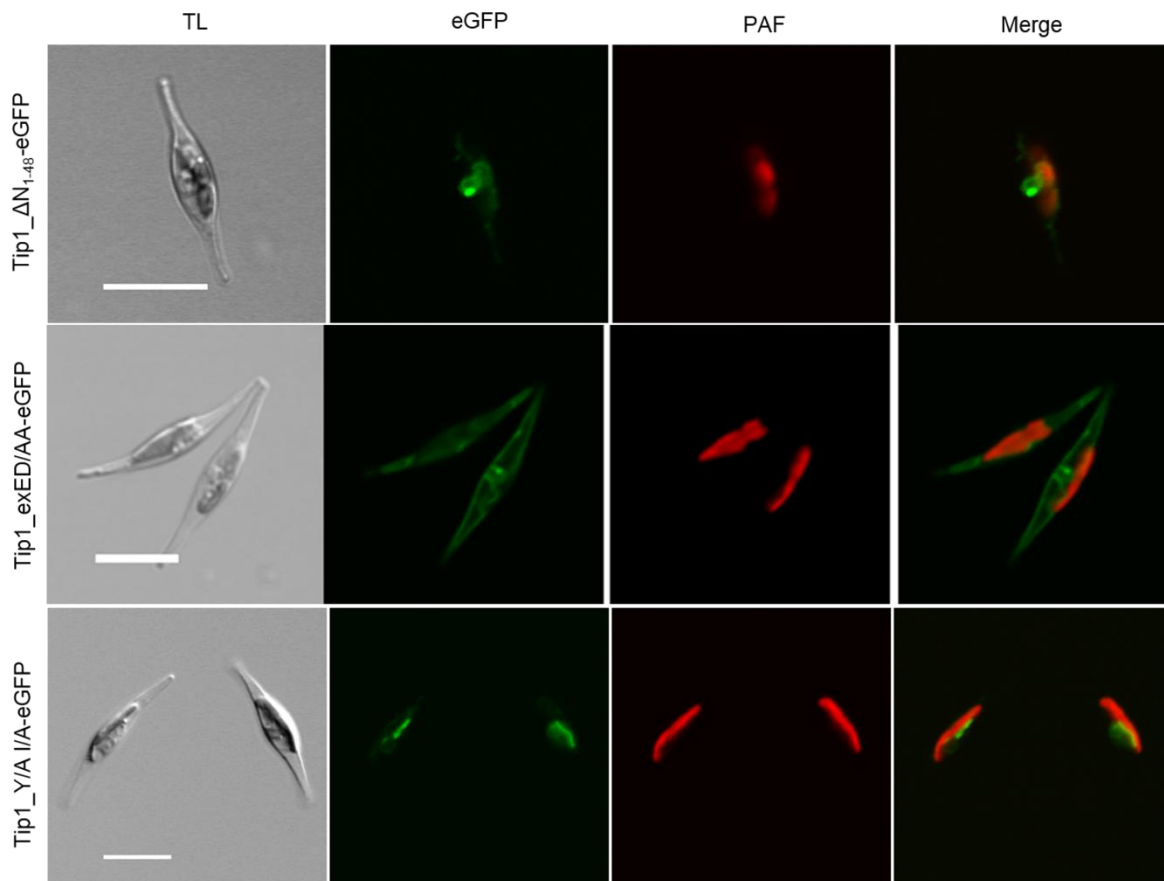


Abbildung 22: Subzelluläre Lokalisation modifizierter TIP1-Varianten. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte über den Nitratreduktase-Promotor. Die Deletion des N-terminus (TIP1 Δ N₁₋₄₈) wie auch die Mutation des putativen Tyrosinmotivs im N-terminalen Bereich von TIP1 (TIP1_Y/A I/A) hat Auswirkung auf die vakuoläre Lokalisation. Der Austausch der sauren Aminosäuren im N-Terminalen Bereich hat dagegen keinen Einfluss auf den Proteintransport von TIP1. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge= Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab= 10 μ m.

2.3.2.3 Targetingmotiv-Screening: Identifizierung putativer Targetingmotive mittels *eukaryotic linear motif resource*

Für die Suche möglicher Targetingsignale in den identifizierten Vakuolenmembranproteinen (s. Kap. 2.4.2.2), wurden die Aminosäuresequenzen dieser mit dem Onlinetool der *eukaryotic linear motif resource* (ELM, <http://elm.eu.org/search/>) untersucht (s. Anhang Tab. 31). Dieses Onlinetool hat den Vorteil, dass neben der Identifizierung von putativen Proteinmotiven ein Algorithmus für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit eines solchen Motivs vorhanden ist. Zum anderen werden Motive, die in einer vorhergesagten Transmembrandomäne liegen, erkannt und als solches annotiert.

Im weiteren Verlauf wurden die vorhergesagten Dileucin- oder Tyrosinmotive von 45961, VCT3 und TPK2 näher untersucht. Für 45961 wurden insgesamt sechs Sequenzabfolgen detektiert, die für Tyrosin- bzw. Dileucinmotive in Frage kämen, von denen fünf Sequenzabfolgen im Bereich einer Transmembrandomäne liegen. Das bereits im YGSI-Screening gefundene, mögliche Tyrosinmotiv wurde ebenfalls mithilfe des Onlinetools mit hoher Wahrscheinlichkeit (e-Wert= 2.5e-3) als

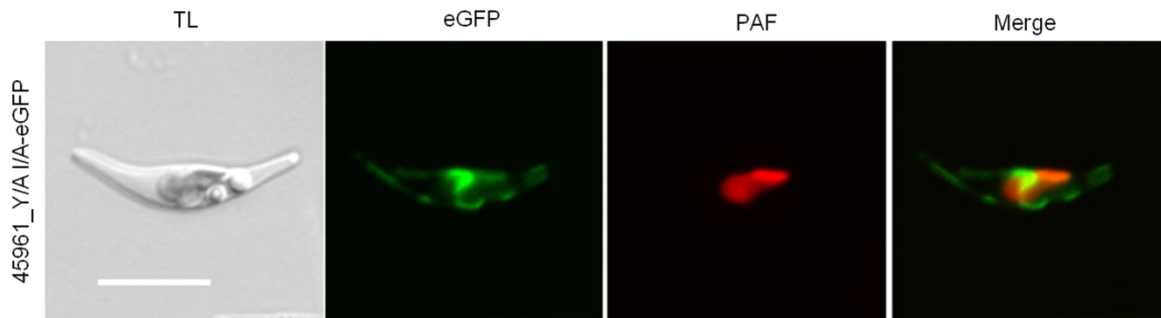


Abbildung 24: *In vivo* Lokalisation von 45691_Y/A I/A-eGFP. Die Fluoreszenz von 45691_Y/A I/A-eGFP wurde hauptsächlich in der Mitte der Zelle beobachtet, ebenso konnte Fluoreszenz in der Plasmamembran bzw. in der Zellperipherie detektiert werden, die nicht durchgängig ist. Das Fusionsprotein wurde mittels Nitratreduktase-Promotor exprimiert. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge= Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab= 10 µm.

Die *in vivo* Lokalisation des modifizierten 45961, als eGFP-Fusionsprotein exprimiert, resultierte im Vergleich zum unveränderten 45961-eGFP in einem divergenten Fluoreszenzmuster (Abb. 24), das eine sichelähnliche Struktur in der Mitte der Zelle zeigt. Des Weiteren konnte eine nicht durchgängige Fluoreszenz an bzw. in der Nähe der Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 24).

Für VCT3 wurde zunächst das N-terminale Dileucinmotiv modifiziert. Die Aminosäureaustauschmutante VCT3_E/A, exprimiert als eGFP-Fusionsprotein, zeigte eine Misslokalisierung, die ein punktuell Fluoreszenzmuster im Zentrum der Zelle zeigte (Abb. 25). Beim Aminosäureaustausch der sauren Aminosäure und den Dileucinen gegen Alanine (VCT3_E/A LI/AA) konnte bei den *in vivo* Lokalisationsstudien eine Lokalisation im ER festgestellt werden. Wurde im Gegensatz das vorhergesagte Tyrosinmotiv modifiziert, lokalisierte VCT3_Y/A V/A-eGFP anstelle in der Membran der zentralen Vakuole in der Plasmamembran, was bereits bei einer Mutation von vakuolären Membranproteinen in mehreren Fällen beobachtet werden konnte (Yamada et al. 2010; Wolfenstetter et al. 2012), weshalb auch dieses Targetingsignal für das vakuoläre *targeting* als essentiell angesehen werden kann. Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine Doppelmutante erstellt, in der sowohl die relevanten Aminosäuren des Dileucinmotivs (AETPAA) als auch das Tyrosinmotiv (AQAA) modifiziert wurden. Die modifizierten Varianten wurden subzellulär als eGFP-Fusionsproteine lokalisiert. Das Fusionsprotein VCT3_dMut-eGFP zeigte wie das Fusionsprotein VCT3_E/A LI/AA-eGFP eine Fluoreszenz im ER. Zur Verifizierung beider für den Proteintransport relevanter Targetingsignalen (EETPLI und YQAV) wurden zwei Chimäre generiert, bei denen zum einen der N-Terminus von VCT3 einschließlich der ersten Transmembrandomäne und dem Dileucinmotiv EETPLI (AS 1-48) an eine verkürzte Variante von PIP1 (AS 1-46) N-terminal fusioniert wurde. Eine weitere Chimäre beinhaltet einen verlängerten N-Terminus von VCT3, der neben dem Dileucinmotiv zusätzlich die ersten vier Transmembrandomänen einschließlich des Tyrosinmotivs

YQAV enthält. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Chimäre VCT3Nt-PIP1 als eGFP-Fusionsprotein exprimiert werden und subzellulär im ER lokalisiert werden (s. Abb. 49).

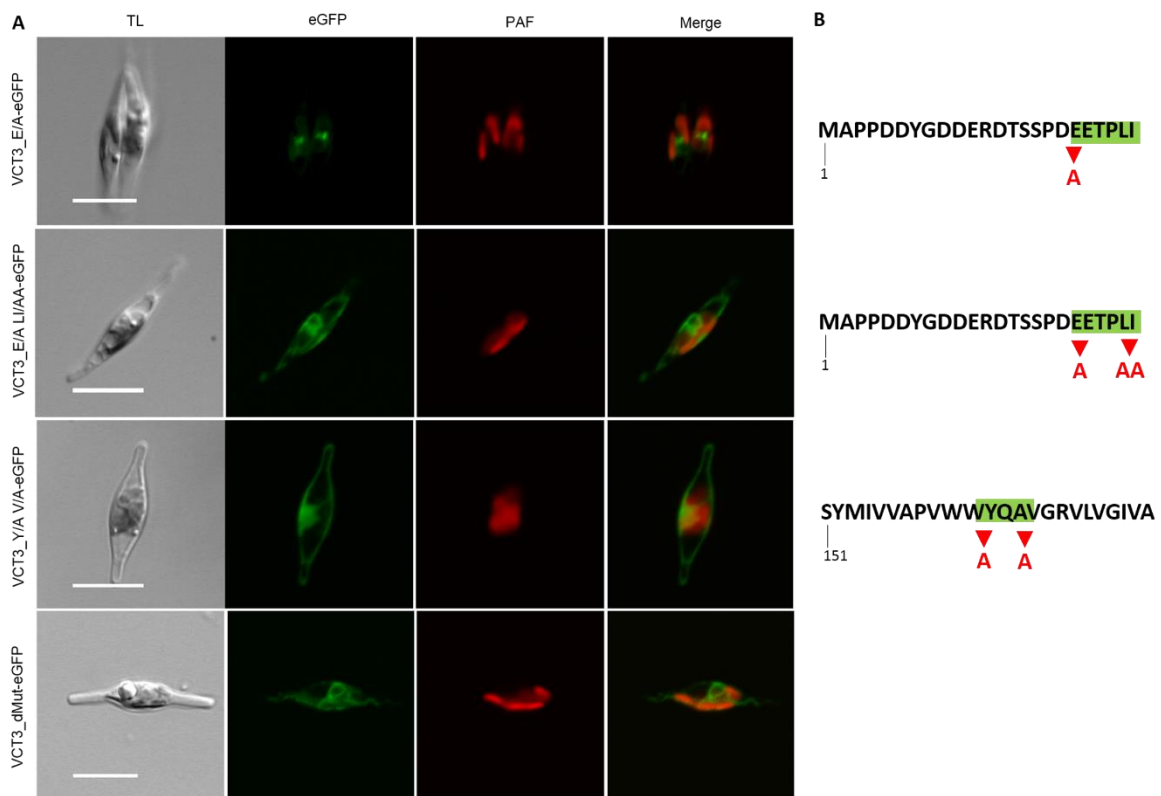


Abbildung 25: *In vivo* Lokalisation der Aminosäureaustauschmutanten von VCT3. (A) Das Fusionsprotein VCT3_E/A-eGFP zeigt eine Misslokalisierung, die als punktuelle Strukturen im Zentrum der Zelle detektiert werden konnte. Für VCT3_E/A LL/AA-eGFP konnte eine Lokalisation im ER beobachtet werden. Die Mutation des Tyrosinmotivs YQAV zu AQAA führte zu einer Integration des Fusionsproteins in die Plasmamembran. Eine Mutation beider Targetingsignale resultierte in einer Lokalisation im ER. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge= Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab= 10 µm. (B) Aminosäuresequenzen des N-Terminus von VCT3. Targetingmotive hervorgehoben in grün, Mutationen sind in rot markiert.

Die identifizierten Tyrosinmotive für TPK2 wurden für weitere Untersuchungen des Proteintransportes wie bereits vorher beschrieben modifiziert, sodass Tyrosin und die sperrige Aminosäure gegen Alanin ausgetauscht wurden (Abb. 26B). Während der Aminosäureaustausch der Tyrosinmotive YDEF zu ADEA und YMLV zu AMLA keinen Einfluss auf die Integration von TPK2 in die Membran der zentralen Vakuole hat, zeigt das Fusionsprotein TPK2_Y/A I/A-eGFP eine Fluoreszenzstruktur, die vergleichbar mit einer Lokalisation von integralen Proteinen im cER ist (Abb. 26A).

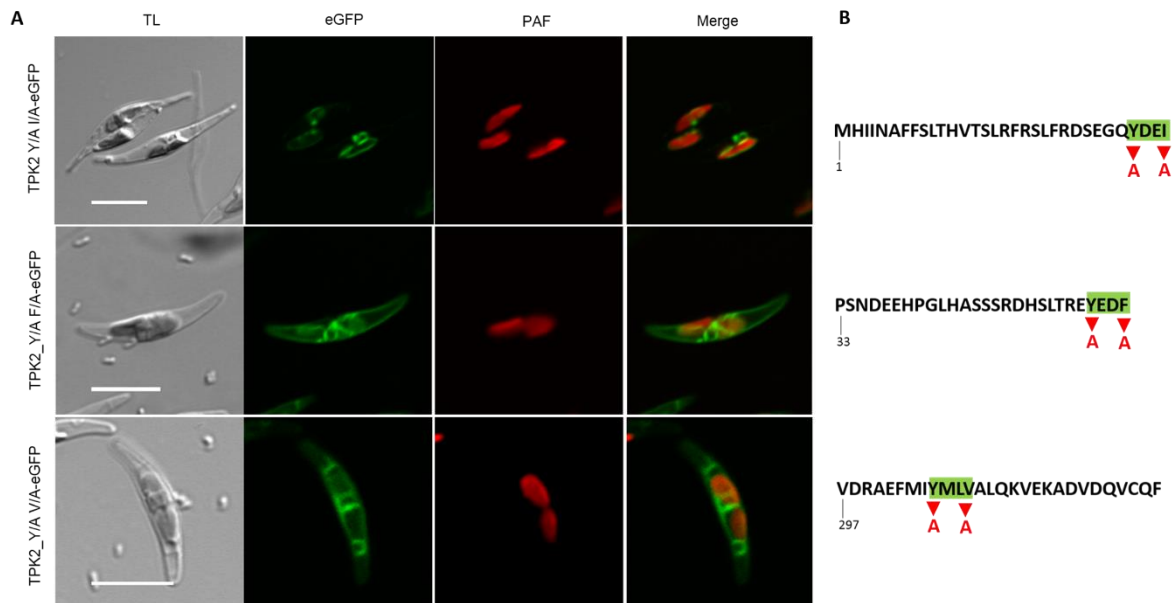


Abbildung 26: Subzelluläre Lokalisation der Aminosäureaustauschmutanten von TPK2. (A) TPK2_Y/A F/A-eGFP und TPK2_Y/A V/A-eGFP wurden in der Vakuolenmembran lokalisiert. Die Mutation des Tyrosinmotivs YDEI führte zu einer Lokalisation im cER. TL= *transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge= Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab= 10 μ m (B) Aminosäuresequenzen von TPK2 mit den vorhergesagten Tyrosinmotiven. Motive hervorgehoben in grün, Mutationen sind in rot markiert.

2.3.3 Interaktionsstudien mit CBS und μ -Untereinheiten der Adapter Protein Komplexe

Da für CBS ein C-terminales Dileucinmotiv für den Proteintransport zur Vakuole essentiell ist (s. Kap. 2.2.4.2), wurden Interaktionsstudien mit der μ -Untereinheit der Adapterprotein (AP)-Komplexe durchgeführt. Die Interaktion von AP-Untereinheiten und Dileucin- bzw. Tyrosinmotiven konnte nachweislich *in vitro* beobachtet werden (zusammengefasst in Bonifacino und Traub 2003). Beim gezielten Screening der Genomdatenbank von *P. tricornutum* wurden vier μ -Untereinheiten der AP-Komplexe AP1-AP4 identifiziert (Tab. 9), die eine Sequenzähnlichkeit zu den μ -Untereinheiten von *A. thaliana* aufwiesen. Mittels bioinformatischer Analysen konnte gezeigt werden, dass keines dieser Proteine eine vorhergesagte Transmembrandomäne oder eine N-terminale Zielsteuerungssequenz besitzt. Die codierenden Sequenzen der vier μ -Untereinheiten wurden jeweils aus gDNA amplifiziert und für eine Lokalisation mit *egfp* fusioniert. Da die Lokalisation der Fusionsproteine von AP1 μ - AP4 μ erfolgreich war (s. Anhang Abb. 50) konnten die Proteine für Interaktionstests mittels des Split-GFP-Systems verwendet werden. Zu diesem Zweck wurden Fusionskonstrukte designt, bei denen die codierende Sequenz von C-GFP C-terminal an *cbs* fusioniert wurde, während die Position für *n-gfp* an die jeweiligen μ -Untereinheiten der AP-Komplexe variierte. Die Expression beider Fusionskonstrukte erfolgte simultan über den Nitratreduktase-Promotor induzierbaren pPha_DUAL 2xNR-Vektor. Eine Interaktion der μ -Untereinheiten der AP-Komplexe mit CBS konnte über bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (BiFC) weder nach 48 h noch nach längerer Induktionszeit nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 9: Identifizierte Untereinheiten der Adapter Protein Komplexe 1-4.

Pt. ID (filtered model ID), Name	At. Homolog, e-Wert	Konservierte Proteindomäne	Anmerkung	Lokalisation
18241, AP3μ	AT1G10890 1e-52	AP-3_Mu3_Cterm		Cytoplasma
54375, AP1μ	AT1G10890 0.0	AP-1_Mu1_Cterm		Cytoplasma
45284, AP4μ	AT1G10890 1.e-69	AP-4_Mu4_Cterm		Cytoplasma
18142, AP2μ	AT1G10890 4.e-133	AP-2_Mu2_Cterm		Cytoplasma

In der Tabelle wurden die μ -Untereinheiten der Adapterprotein (AP)-Komplexe aufgelistet, die *in silico* mittels diverser bioinformatischen Tools analysiert wurden. Die Protein IDs stammen aus der *P. tricornutum* bzw. der *A. thaliana*-Datenbank. Pt= *Phaeodactylum tricornutum*; At= *Arabidopsis thaliana*

2.4 Vacuolar Sorting Receptors (VSRs) in *Phaeodactylum tricornutum*

Der Transport von löslichen vakuolären Proteinen erfolgt über *vacuolar sorting receptors* (VSRs) (s. Kap. 1.3.4). Im Genom der Diatomee *P. tricornutum* konnten Gene identifiziert werden, die für VSR-ähnliche Proteine codieren. In vorherigen Arbeiten konnten die putativen VSRs ptVSR1 (42953), ptVSR2 (46131) und ptVSR3 (48084) bereits mittels bioinformatischen Tools analysiert und subzellulär als eGFP-Fusionskonstrukte in *P. tricornutum* *in vivo* lokalisiert werden (Happel 2014). Des Weiteren konnte über Carbonatextraktionen mit anschließenden Western Blot und Immunodetektion gezeigt werden, dass die lokalisierten VSR-Fusionsproteine als Membranproteine vorliegen (Happel 2014).

In der Publikation von Shen und Kollegen konnte in pflanzlichen, transgenen PSB D-Zellen gezeigt werden, dass C-terminal verkürzte VSRs, d.h. durch die Abwesenheit der Transmembrandomäne und des Tyrosinmotivs, zusammen mit ihren Cargoproteinen in den extrazellulären Raum sekretiert wurden (Shen et al. 2013). Die verkürzten Rezeptoren ermöglichten eine Untersuchung der putativen Cargoproteine über Massenspektroskopie, wodurch mehrere Cargoproteine sowohl als luminal Vakuolenproteine als auch als Interaktionspartner der VSRs verifiziert werden konnten. Analog wurde dieser Versuchsansatz in der Diatomee *P. tricornutum* mit den bereits identifizierten VSRs durchgeführt.

2.4.1 Untersuchung auf Sekretion von modifizierten *vacuolar sorting receptors*

Für die Modifizierung der VSRs aus *P. tricornutum* wurden mittels TOPCONS die Transmembrandomänen vorhergesagt. Ausgehend von dieser Vorhersage, wurden mittels PCR die verkürzten Varianten der VSRs generiert und C-Terminal entweder mit einem 10x-Histag oder mit eGFP fusioniert. Die GFP-Fusionskonstrukte wurden hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation mittels KLSM untersucht. ptVSR1-eGFP und ptVSR3-eGFP zeigten, exprimiert in voller Länge, punktartige Strukturen in der Nähe der Plastide (Abb. 27A). PtVSR2-eGFP zeigte hingegen eine

Fluoreszenzstruktur, die sich netzartig über die gesamte Zelle detektieren lässt. Die Deletion der jeweiligen Transmembrandomäne zeigt eine Veränderung des Fluoreszenzmusters (Abb. 27B). Die Deletion der Transmembrandomäne von ptVSR1 (VSR1 Δ TMD) resultierte in einem Fluoreszenzmuster, bei dem ein starkes GFP-Signal im Zentrum der Zelle detektiert werden konnte. Des Weiteren zeigte VSR1 Δ TMD-eGFP ebenfalls eine schwächere Fluoreszenz, die sich über die gesamte Zelle verteilt. Die Fusionsproteine VSR2 Δ TMD-eGFP und VSR3 Δ TMD-eGFP zeigten beide eine ähnliche Lokalisation. Das Fluoreszenzmuster erstreckte sich ebenfalls über die gesamte Zelle mit einer Konzentration im Zentrum.

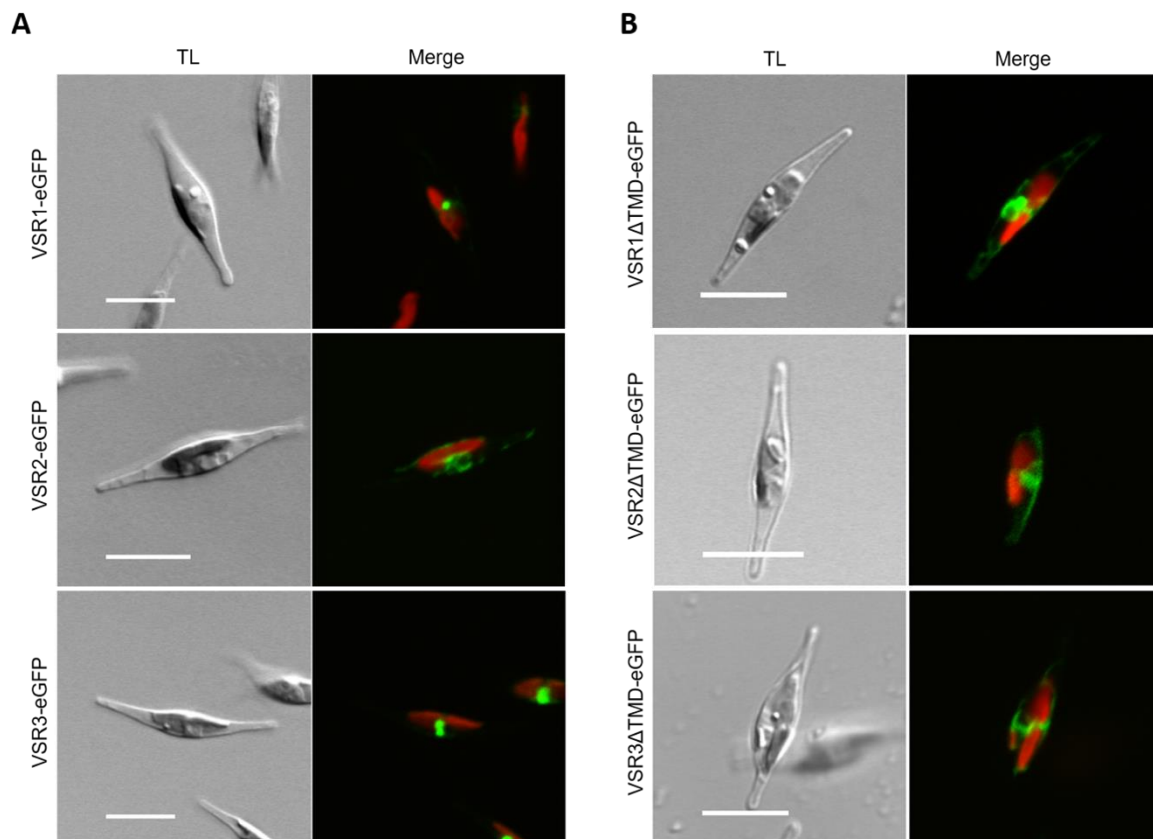


Abbildung 27: Subzelluläre Lokalisation von ptVSR1, ptVSR2 und ptVSR3 sowie ihrer Varianten. (A) subzelluläre Lokalisation der VSRs aus *P. tricornutum* in voller Länge. Während die Fusionsproteine von VSR1 und VSR3 eine punktartige Lokalisation in der Nähe der Plastide zeigten, zeigte das Fluoreszenzmuster von VSR2-eGFP eine Fluoreszenz, die sich über die gesamte Zelle ausbreitet. (B) subzelluläre Lokalisation von VSR1 Δ TMD-eGFP, VSR2 Δ TMD-eGFP und VSR3 Δ TMD-eGFP. Nach der Deletion der jeweiligen Transmembrandomäne zeigten alle Fusionsproteine eine Fluoreszenzstruktur, die sich über die gesamte Zelle ausbreitet. TL=transmitted light; eGFP=enhanced green fluorescent protein; PAF= Plastidenautofluoreszenz; Merge= Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab= 10 μ m.

Um die Deletion der Transmembrandomänen in den modifizierten VSRs zu verifizieren, wurde eine Carbonatextraktion zur Überprüfung der Membranintegrität durchgeführt. Der Western Blot mit anschließender Immunodetektion zeigte für die Fusionsproteine VSR1 Δ TMD-eGFP, VSR2 Δ TMD-eGFP, VSR3 Δ TMD-eGFP ein Signal in der löslichen Fraktion (Abb. 28). In den Kontrollen für die löslichen Fraktionen (α -Rbcl) konnte ebenfalls die Kontrolle für die integrale Fraktion (PsbD) detektiert werden.

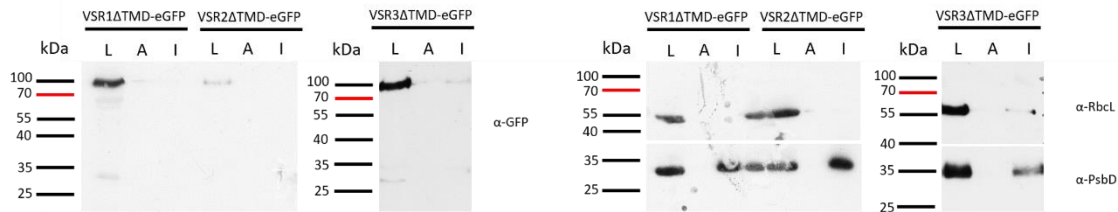


Abbildung 28: Western Blot mit anschließender Immunodetektion nach der Carbonatextraktion der Fusionsproteine VSR1ΔTMD-eGFP, VSR2ΔTMD-eGFP und VSR3ΔTMD-eGFP. Ausgehend von der Proteinkonzentration der Integralen Fraktion (5 µg) wurden für alle Fraktionen gleiche Verhältnisse aufgetragen. Die Detektion der eGFP-Fusionsproteine erfolgte mittels GFP-Antikörper (1:3.000). Als Kontrolle für die lösliche Fraktion diente der Antikörper gegen die große Untereinheit von Rubisco (α-RbCL, 1:7.500), für die Integrale Kontrolle wurde der Antikörper gegen eine Untereinheit des Photosystems II (α-PsbD, 1:7.500) verwendet. L= lösliche Fraktion; A= assoziierte Fraktion, I= integrale Fraktion. Berechnete molekulare Massen der Fusionsproteine ca. 80 kDa (Western Blot von VSR1ΔTMD-eGFP und VSR2ΔTMD-eGFP aus Puzik 2016).

Der Test auf die Sekretion der modifizierten VSRs wurde mit Konstrukten durchgeführt, die anstelle des C-terminalen eGFPs einen 10xHistag aufwiesen, da das exprimierte eGFP-Fusionskonstrukt möglicherweise durch die molekulare Masse von eGFP die Sekretion verhindert (Franziska Hempel, persönliche Kommunikation). Es wurden jeweils zwei Klone pro Konstrukt auf Sekretion untersucht und zum einen der Gesamtproteinextrakt als auch aufkonzentriertes Medium der *P. tricornutum*-Kultur auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine auf dem SDS-Gel wurden im Anschluss mittels Instant Blue eingefärbt (Abb. 29). Im aufkonzentrierten Medium konnten in allen Proben jeweils zwei Banden bei ca 100 kDa und 130 kDa detektiert werden, die der Größe sekretierter alkalischen Phosphatasen entsprechen (Abb. 29B) (Lin et al. 2013; Maurer 2014). Neben diesen Banden konnten drei weitere spezifische Banden bei ca 55 kDa (für VSR1ΔTMD Klon 2 und VSR2ΔTMD Klon 5) und bei ca. 60 kDa (ebenfalls in VSR2ΔTMD K5) detektiert werden. VSR1, VSR2 und VSR3 haben jeweils ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa, die den spezifischen detektierten Banden im aufkonzentrierten Medium entsprechen könnten. Eine distinkte Band auf dieser Höhe konnte allerdings im Gesamtproteinextrakt nicht detektiert werden.

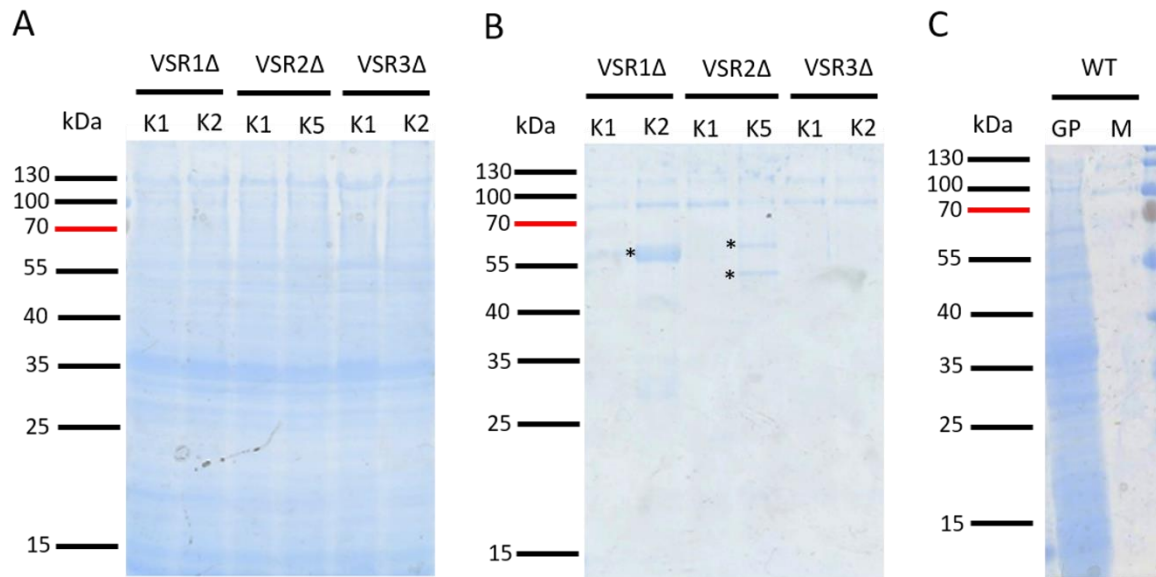


Abbildung 29: SDS-Gel nach Behandlung mit Instant Blue. Aufgetragen wurden die Gesamtproteinextrakte (A), gewonnen aus *P. tricornutum*-Kulturen, die zuvor jeweils mit den Fusionskonstrukten *vsr1Δtmd-his*, *vsr2Δtmd-his* und *vsr3Δtmd-his* transfiziert wurden, sowie die aufkonzentrierten Medien der jeweiligen *P. tricornutum*-Kultur (B). Die Fusionsproteine wurden über einen induzierbaren Nitratreduktase-Promotor exprimiert. Als Kontrolle diente eine Wildtyp-Kultur von *P. tricornutum* (C). Im Gesamtproteinextrakt konnten mehrere Banden detektiert werden, eine distinkte Bande für die Fusionsproteine ist nicht zu erkennen. Das aufkonzentrierte Nährmedium der Fusionsproteine VSR1ΔTMD-His und VSR2ΔTMD-His zeigten im Vergleich zum Nährmedium des Wildtyps distinkte Banden zwischen 50 und 60 kDa, die der Größe der Fusionsproteine entsprechen. Die Banden aus dem aufkonzentrierten Medium wurden für eine massenspektrometrische Analyse aus dem SDS-Gel ausgeschnitten (mit einem Stern markiert). WT= Wildtyp; GP= Gesamtproteinextrakt; M= aufkonzentriertes Medium.

Um die sekretierten Proteine identifizieren zu können, wurden die markanten Banden ausgeschnitten und über *Hydrogen-Deuterium Exchange* (HDX)-Massenspektroskopie analysiert. Bei der massenspektroskopischen Analyse konnte VSR1ΔTMD-His mit hoher Wahrscheinlichkeit im Medium detektiert werden (Tab. 10). Neben dem Rezeptor konnten zusätzlich drei weitere Proteine detektiert werden (ID 49286, 54467 und 37965). Die identifizierten Proteine wurden mittels bioinformatischen Vorhersagetoools analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass zwei Proteine (54467 und 37956) ein putatives Signalpeptid besitzen. Für 54467 konnte eine Transmembrandomäne vorhergesagt werden. Auffällig ist, dass die Proteine 54467 und 49286 keine konservierte Proteindomäne aufweisen (s. Tab. 10). 37956 besitzt eine GAT1 Peptidase Proteindomäne, 50412 weist eine Proteindomäne auf, die in Glycosyltransferasen zu finden ist.

Tabelle 10: Identifizierte Proteine des aufkonzentrierten Medoiums mittels HDX-Massenspektroskopie.

Pt. ID (filtered model ID), Name	Signalpeptid (+/-)	TMD	Konservierte Proteindomäne	Annotierung	Anmerkung
42953	+	1	PA-superfamily		VSR1
49286	-	0			
54465	+	1		Stark exprimiert bei Eisenmangel	ISIP2A
37956	+	0	GAT1 Peptidase		

Aufgelistet wurden die Protein IDs der *P. tricornutum* Datenbank, die identifiziert wurden, sowie die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse. + = vorhergesagtes Signalpeptid; - kein vorhergesagtes Signalpeptid; TMD= Transmembrandomäne

Basierend auf den bioinformatischen Analysen wurde die Proteinsequenz von 37956 auf mögliche ssVSD bzw. ctVSD untersucht. Weder ein prägnanter hydrophober Bereich in der Region des C-Terminus noch ein sequenzspezifisches Targetingmotiv am N-Terminus konnte identifiziert werden.

2.5 Phylogenetische Analysen der vakuolären Proteine von *P. tricornutum*

In vivo Lokalisationsstudien konnten das Proteom der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* erweitern (s Kap. 2.2). Um die phylogenetische Herkunft der zentralen Vakuole näher zu bestimmen, wurden die Aminosäuresequenzen der vakuolären Proteine für die Berechnung von phylogenetischen Stammbäumen verwendet. Für die primäre Analyse wurden Alignments der jeweiligen Aminosäuresequenzen der vakuolären Proteine aus *P. tricornutum* mit Aminosäuresequenzen der Amoebozoa, Opisthokonta, Viridiplantae, Rhodophyta, Cryptophyta, Haptophyta und Vertreter der SAR-Klade aus einer BLASTp-Analyse erstellt. Die phylogenetischen Stammbäume wurden mittels *maximum likelihood* Methode berechnet. Aus den phylogenetischen Analysen für die Proteine 45961, VCT6, TPK2, TIP1, MATE2, ABC3 und Peptidase1 konnte keine Aussage über die Verwandtschaftsbeziehung getroffen werden, da sich keine eindeutige Gruppierung zeigte (s. Anhang Abb. 51-57).

Die vorläufigen phylogenetischen Analysen für die Proteine β -GLYC2, CAT1, CBS, MATE1, VCT3 und VTC2 zeigten jedoch eine erkennbare Gruppierung der verschiedenen Taxa. Die Sequenzen von β -GLYC1, β -GLYC2, CAT1, CBS, VTC2 und MATE1 liegen in der Gruppe der Stramenopiles, während VCT3 zusammen mit den Sequenzen der Haptophyta eine Gruppe bildet (Abb. 34). Die aus den phylogenetischen Analysen resultierende Gruppe der Stramenopiles zeigen verschiedene Schwestergruppen. So bilden die Sequenzen von CBS und VTC2 zusammen mit den jeweiligen Sequenzen der Stramenopiles eine Schwestergruppe mit den Sequenzen der Rhodophyta (Abb. 30 und 31), während die Gruppe der Stramenopiles einschließlich der Sequenz von CAT1 eine Schwestergruppe zu den Chlorophyta bildet (Abb. 32).

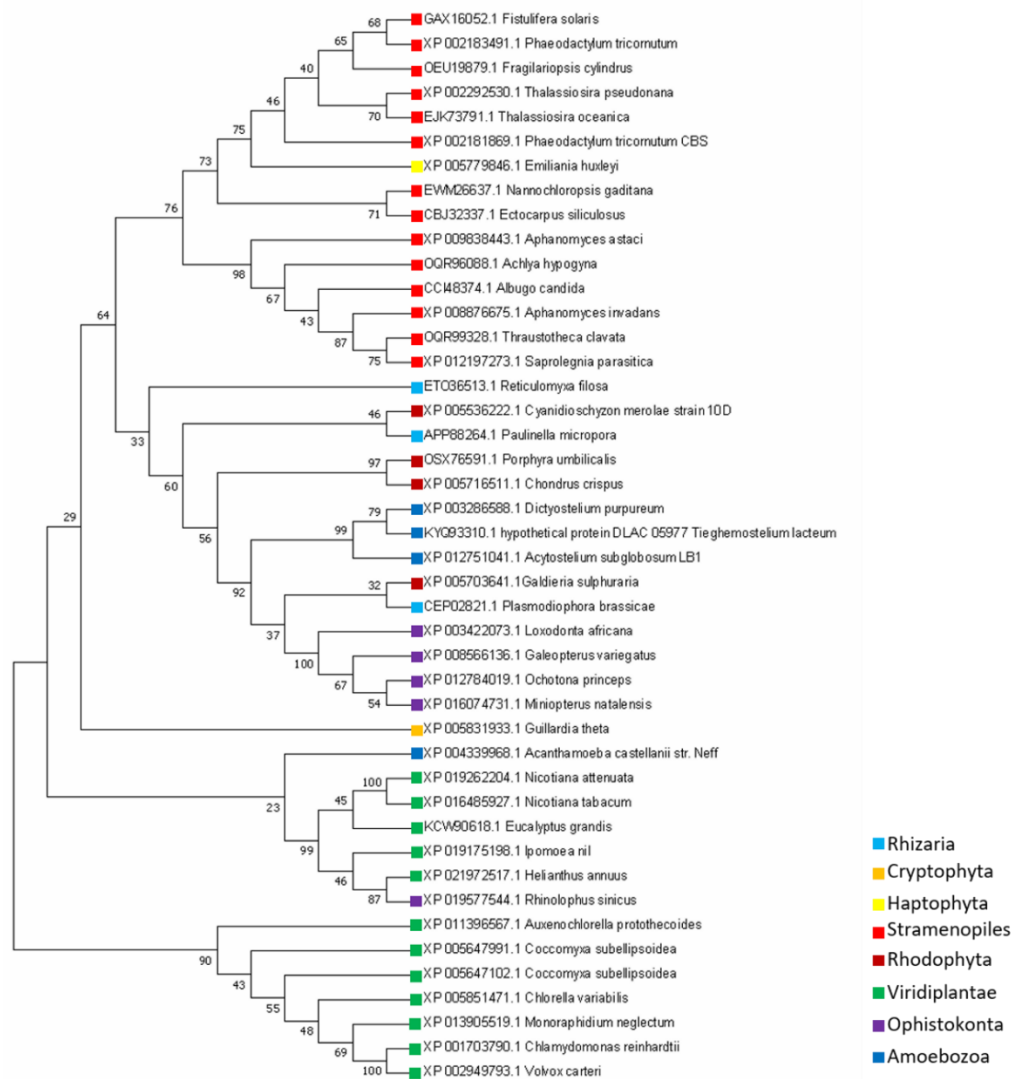


Abbildung 30: Phylogenetische Analyse von CBS. CBS wurde in die Gruppe der Stramenopiles eingegliedert und bildet eine Schwestergruppe zu den Rhodophyta. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

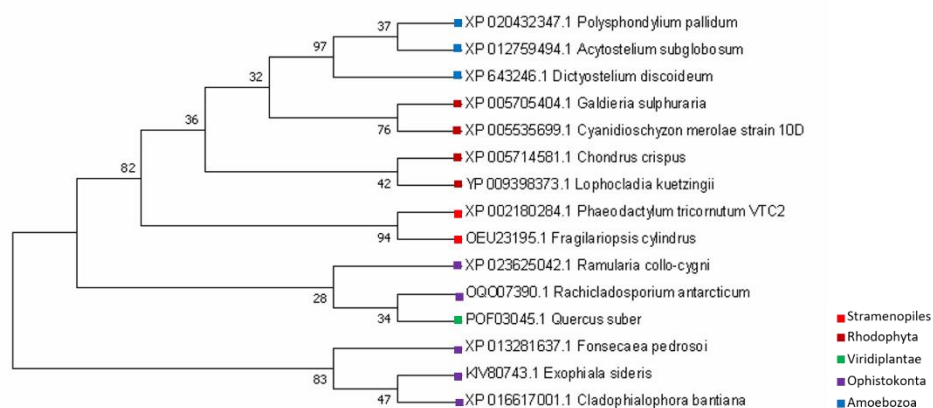


Abbildung 31: Phylogenetische Analyse von VTC2. Die Stramenopiles einschließlich der Sequenz von VTC2 bilden eine Schwestergruppe zu der Gruppe der Rhodophyta. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

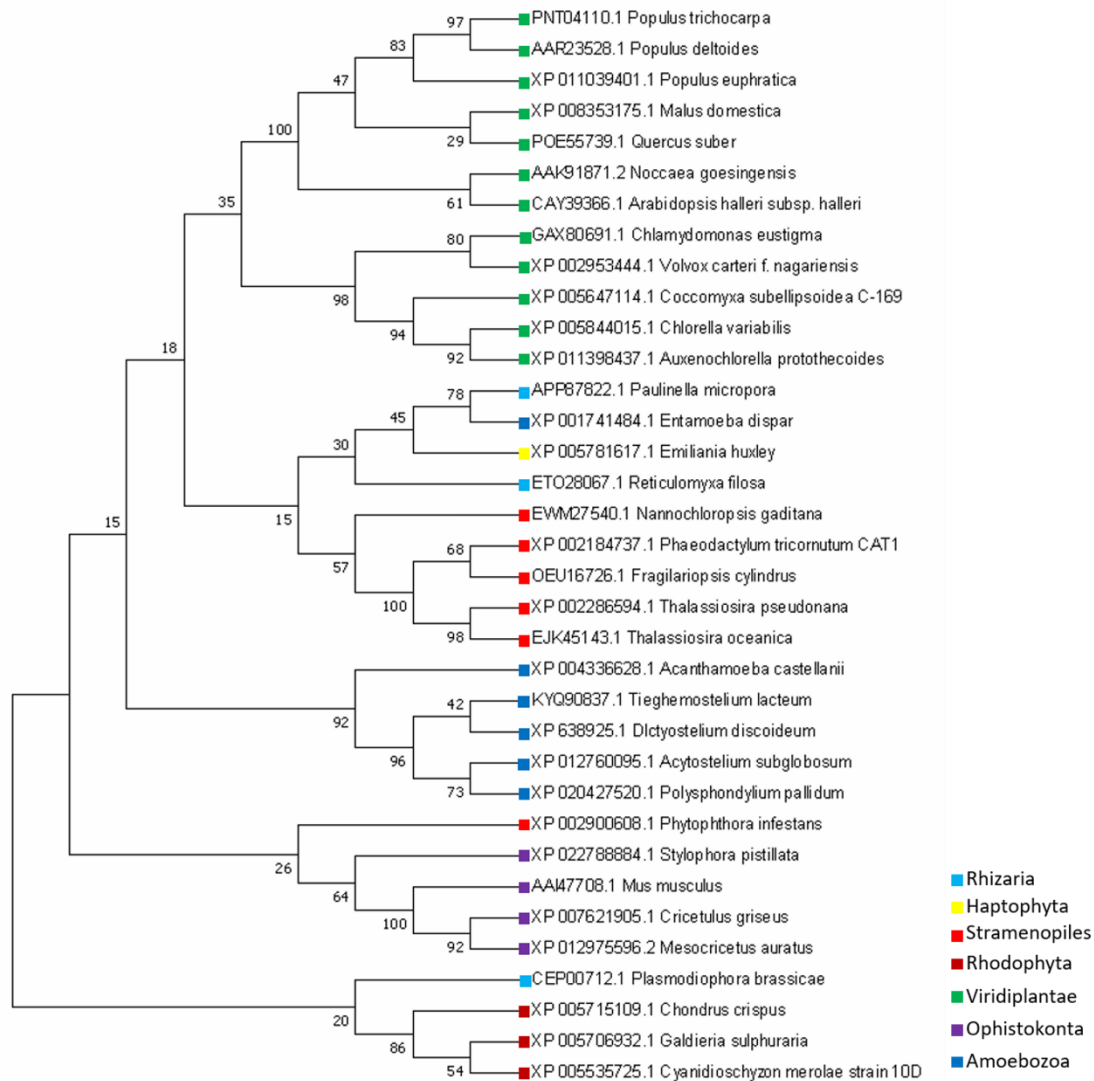


Abbildung 32: Phylogenetische Analyse von CAT1. CAT1 konnte anhand phylogentischer Berechnungen in die Gruppe der Stramenopiles eingegliedert werden. Die Stramenopiles bilden eine Schwestergruppe zu den Chlorophyten. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

Die Gruppierung der Sequenzen von MATE1 und VCT3 hingegen zeigen eine nähere Verwandtschaft zur Gruppe der Ophisthokonta (Abb. 33 und 34).



Abbildung 33: Phylogenetische Analyse von VCT3. VCT3 zeigt eine nahe Verwandtschaft zur Gruppe der Ophisthokonta. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

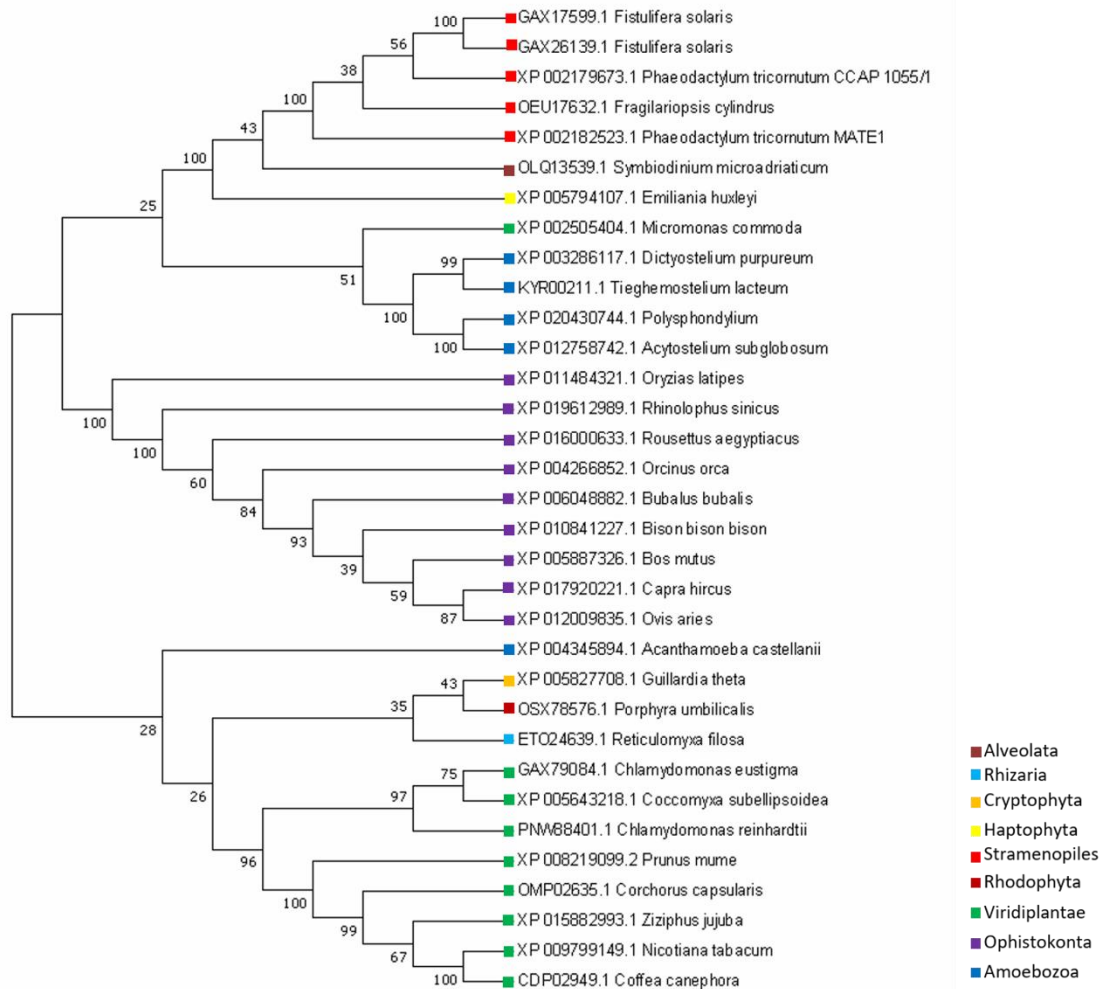


Abbildung 34: Phylogenetische Analyse von MATE1. MATE1 konnte durch phylogenetische Analysen den Stramenopiles zugeordnet werden. Die Stramenopiles bilden eine Schwestergruppe zu den Ophisthokonta. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

Die Sequenzen von β -GLYC1 und β -GLYC2 bilden jeweils mit weiteren Vertreter der Stramenopiles eine Schwestergruppe zu den Amoebozoa (Abb. 35 und 36).

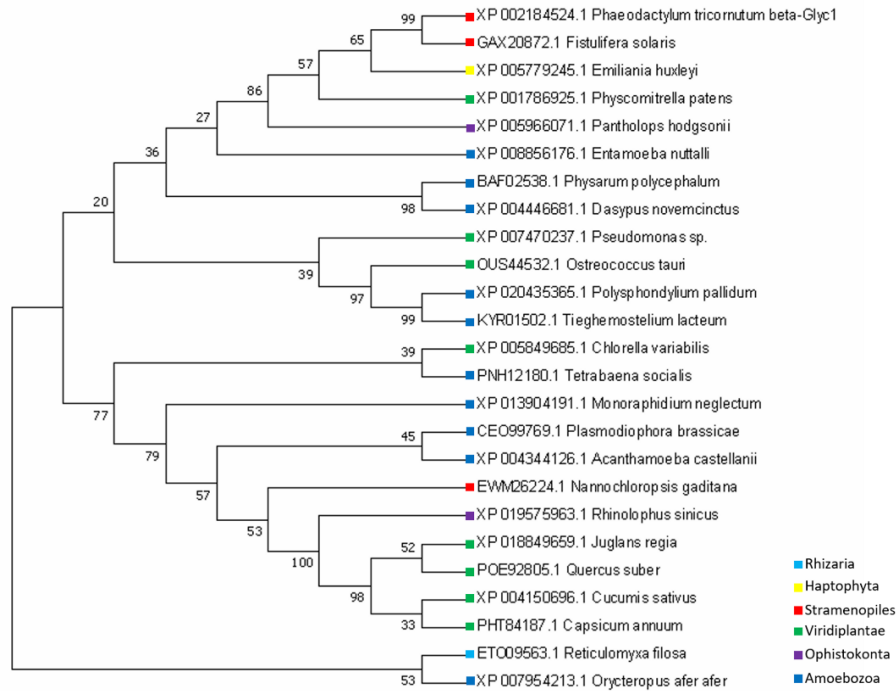


Abbildung 35: Phylogenetische Analyse von β -GLYC1. β -GLYC1 bildet mit weiteren Vertretern der Stramenopiles eine Schwestergruppe zu den Amoebozoa. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf der JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

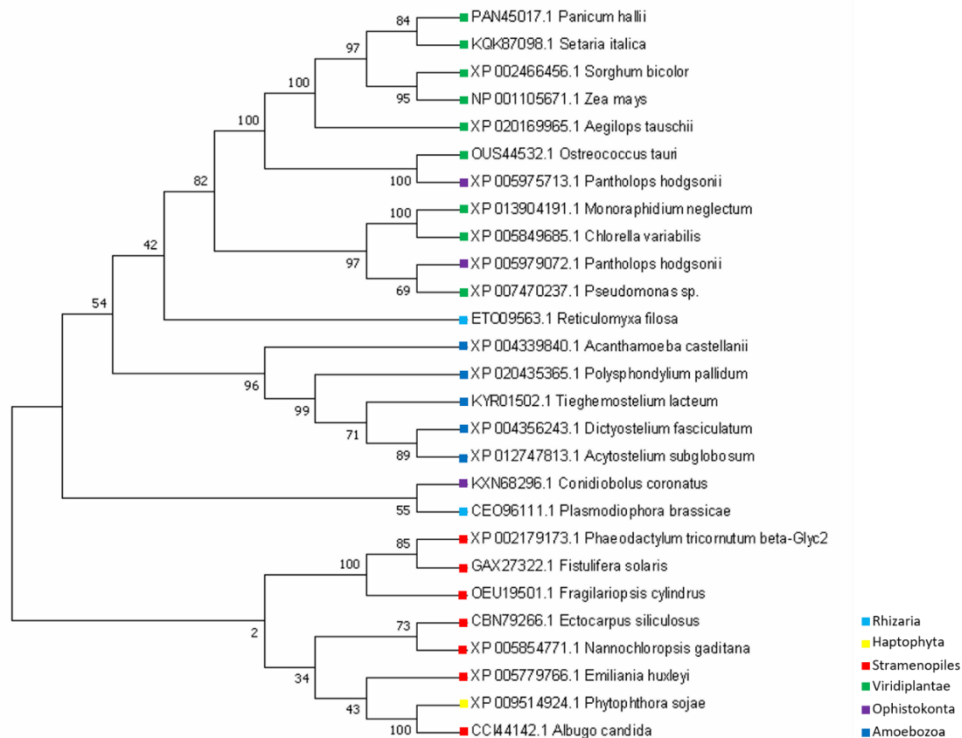


Abbildung 36: Phylogenetische Analyse von β -GLYC2. Die Gruppe der Amoebozoa bildet eine Schwestergruppe zu den Stramenopiles. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf der JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

3 Diskussion

Eukaryoten besitzen neben dem Nukleus Reaktionsräume, die durch Membranen räumlich voneinander getrennt sind. Diese Unterteilung innerhalb der Zelle erlaubt es, verschiedenste Stoffwechselreaktionen auf engsten Raum ablaufen zu lassen, wodurch die für den Metabolismus relevanten Enzyme in ihrem Reaktionsraum konzentriert werden und somit eine Leistungssteigerung einer spezialisierten Zelle ermöglicht. Zu den (Sub)-Kompartimenten gehören nicht nur das Stroma von Plastiden oder die Matrix der Mitochondrien, sondern auch das Cytoplasma, in das beispielsweise falsch gefaltete ER-Proteine transportiert werden, damit diese über das 26S Proteasom abgebaut werden (Brandizzi et al. 2003). Semi-autonome Organellen hingegen besitzen ihre eigene Maschinerie für lytische Degradationsvorgänge (Leidhold und Voos 2007). Ein wichtiges Kompartiment für den Abbau von Proteinen als auch zur Detoxifizierung der Zelle ist das Lysosom bzw. die Vakuole, die jeweils von nur einer Membran umgeben sind. Sie gehören u.a. neben dem perinuklearen Raum, dem ER, dem Golgi-Apparat und den Endosomen zum Endomembransystem, dessen Membranen über Vesikel miteinander in Kontakt treten können und den Transport von Proteinen und Lipiden gewährleisten. *Phaeodactylum tricornutum*, ein Organismus aus der Gruppe der Heterokontophyta mit komplexer Plastide rhodophytischen Ursprungs, besitzt eine zentrale Vakuole, die als Speicherort von Chrysolaminarin dient (Chiovitti et al. 2004). Es konnten bereits *in silico*-Studien zu putativ wichtigen vakuolären Proteinen hinsichtlich der Chrysolaminarinbiosynthese als auch phylogenetische Analysen zum Proteintransport mittels Transportrezeptoren gemacht werden (Kroth et al. 2008; Becker und Hoef-Emden 2009), allerdings wurden Transportmechanismen von vakuolären Proteinen in phototrophen Protisten noch nicht *in vivo* analysiert.

3.1 Neue Proteine und ihre Funktionen

3.1.1 Proteine mit Sequenzähnlichkeit zu vakuolären Proteinen lokalisieren nicht zwingend in der Vakuole von *P. tricornutum*

Um weitere Erkenntnisse über die Vakuole in phototrophen Protisten zu erlangen, wurden *in vivo* Lokalisationsstudien durchgeführt und die lokalisierten vakuolären Proteine aus *P. tricornutum* näher untersucht. Neben vakuolären Proteinen konnten weitere Proteine, die eine Sequenzähnlichkeit zu Tonoplast- bzw. luminalen Vakuolenproteinen aus *A. thaliana* aufwiesen und als eGFP-Fusionsprotein exprimiert wurden, in der Plasmamembran, der Membran des ERs oder in der Plastide detektiert werden (vgl. Kap. 2.2). Die verschiedenen Lokalisationen zeigen, dass eine Sequenzähnlichkeit zu vakuolären *A. thaliana* Proteinen nicht zwingend eine Lokalisation in der Vakuole von *P. tricornutum* voraussetzt. Die bioinformatischen Analysen mittels BLASTp ergaben

für die identifizierten potentiellen Vakuolenproteine einerseits einen geringen e-Wert (s. Tab. 4-7). Andererseits zeigten die potentiellen Vakuolenproteine Sequenzähnlichkeiten zu verschiedenen *A. thaliana* Proteinen, die entweder im Tonoplasten oder im Lumen der Vakuole lokalisiert sind. Möglicherweise wird die Identifizierung von orthologen Proteinen durch vorhandene Transmembrandomänen erschwert, wodurch in BLASTp-Analysen falsch positive Ergebnisse zustande kommen, zum anderen könnte die Anzahl an Genduplikationen und Isoformen in *A. thaliana* zu falsch positiven Ergebnissen führen.

3.1.2 Die Funktion der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* anhand von lokalisierten Vakuolenproteinen

Aus vorherigen Arbeiten ist bereits bekannt, dass die zentrale Vakuole ein Speicherkompartiment für Chrysolaminarin darstellt (Chiovitti et al. 2004). Des Weiteren konnten zwei putative 1,6- β -Transglykosylasen (TGS1 und TGS2) in der Membran der zentralen Vakuole lokalisiert werden, die möglicherweise bei der Synthese von Chrysolaminarin von Bedeutung sind (Huang et al. 2016). TGS1 und TGS2 weisen Ähnlichkeiten zu den konservierten Proteindomänen Kre1 und Skn1, zwei Glykosylhydrolasen aus *S. cerevisiae*, auf, wodurch vermutet wird, dass TGS1 und TGS2 in die Synthese von 1,6-verbundenen Verzweigungen des Chrysolaminarins involviert sind (Huang et al. 2016). Lokalisationen eines Aquaporins (TIP1) und einer Untereinheit eines ABC-Transporters (ABC3) (Liu et al. 2016) lassen neben der Speicherung und der Biosynthese von Chrysolaminarin weitere Vermutungen über die Funktion der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* zu. So scheint TIP1 als wassertransportierende Membranpore zu fungieren.

ABC-Transporter bilden neben der MFS die größte Klasse der Transportproteine, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Sie gehören zu den primären Transportern, die die für den Transport benötigte Energie aus der Hydrolyse von ATP mittels ATP-Bindung Kassette beziehen (Andre 1995; Del Sorbo et al. 1997; Del Sorbo et al. 2000; Lage 2003). In Pflanzen implizieren ABC-Transporter Detoxifizierungsprozesse von organischen Komponenten, importieren Anionen wie Folate, enzymatische Cofaktoren, in die Vakuole oder fungieren als Transporter für Sekundärmetabolite (Martinoia et al. 2007). Möglicherweise übernimmt ABC3 in der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* den Transport von Sekundärmetaboliten oder von Vorstufen enzymatischer Cofaktoren.

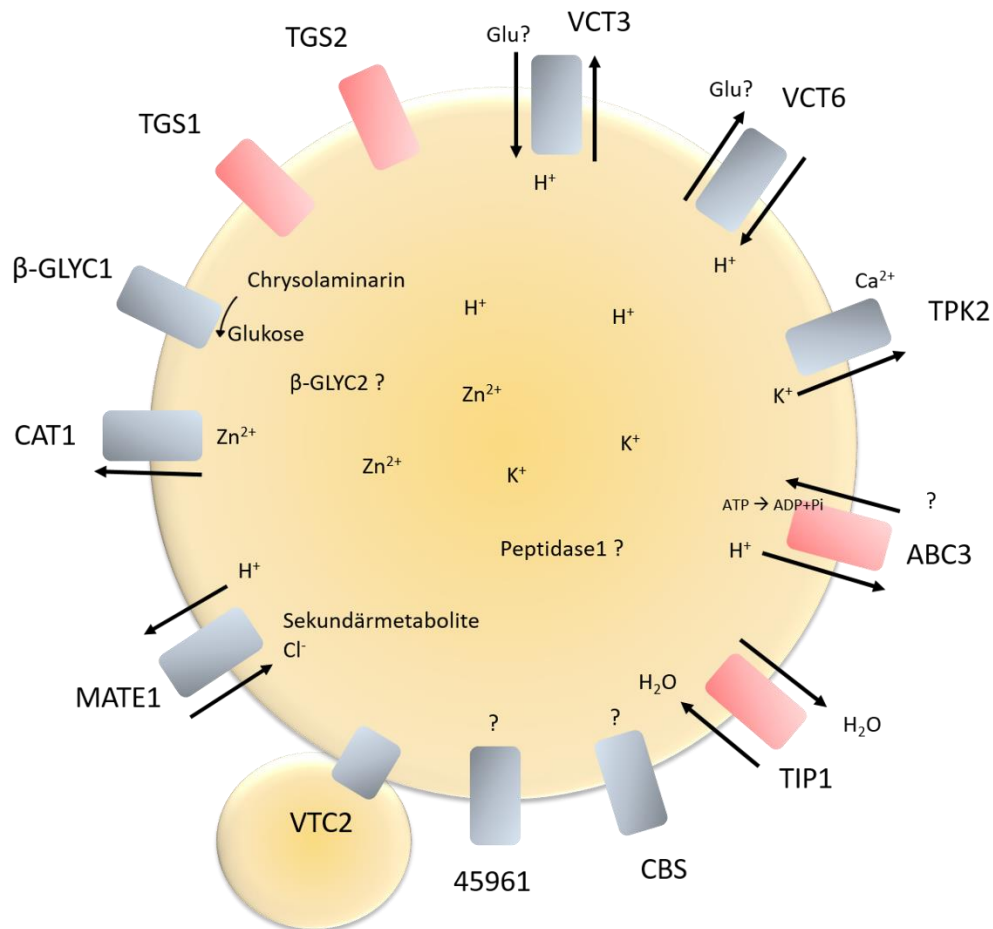


Abbildung 37: Schematische Darstellung der lokalisierten Proteine mit ihrer möglichen Funktion in der zentralen Vakuole von *Phaeodactylum tricornutum*. Zwei putative Zuckertransporter (VCT3 und VCT6) fungieren vermutlich als H⁺-Antipporter, die Glukose oder andere einfache Zucker im- oder exportieren könnten. TPK2 exportiert womöglich unter Abhängigkeit von Calcium, Kalium in das Cytoplasma, wohingegen der Kationen-Effluxtransporter CAT1 möglicherweise für den Transport von Schwermetallen relevant ist. Die Transporter MATE1 und ABC3 transportieren vermutlich Sekundärmetabolite, während die Peptidase1, β-GLYC2 und 45961 relevant für die Degradation von Proteinen sein könnten. TIP1 dient als wassertransportierende Membranpore. CBS könnte eine regulierende Rolle übernehmen. VTC2 ist vermutlich in die Fusion zweier Vakuolen involviert. Die zentrale Vakuole speichert neben Chrysolaminarin Kationen, Anionen, Sekundärmetabolite und Schwermetalle und übernimmt wie Lysosomen den Abbau von Proteinen (ABC3 und TIP1 lokalisiert von Liu et al. 2016, TGS1 und TGS2 aus Huang et al. 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neben bereits bekannten vakuolären Proteinen neun weitere Proteine in der Vakuolenmembran identifiziert werden (Abb. 37), die eine Sequenzähnlichkeit zu Tonoplast- bzw. luminalen Vakuolenproteinen aus *Arabidopsis thaliana* aufweisen. So konnten zwei putative Zuckertransporter (VCT3 und VCT6), die in die Proteinklasse der MFS eingeordnet wurde, in der Membran der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* anhand von eGFP-Fusionsproteine detektiert werden (s. Abb. 8). Zuckertransporter der *major facilitator superfamily* sind in Bezug auf ihre zu transportierenden Substrate hoch variabel. In höheren Pflanzen sind Glukose, Fructose, Saccharose und Stärke die Zuckerverbindungen, die in der Zelle vorhanden sind. Unter Stress können ebenfalls Alditole (Zuckeralkohole, das Reduktionsprodukt aus Monosacchariden) in höherer Konzentration auftreten (Martinoia et al. 2012). Es ist bekannt, dass pflanzliche

Zuckertransporter als Dimere aktiv sind und als Glukose/H⁺ Antiporter (TMT1 und VGT1) oder als H⁺/Inositol Exproter (INT1) in der Vakuole fungieren, in der unter anderem Saccharose gespeichert wird (Wormit et al. 2004). In *P. tricornutum* wird jedoch nicht wie in photosynthetisch aktiven Organismen der grünen Linie Zucker in Form von Stärke in den Plastiden gespeichert (Chauton et al. 2013). Stattdessen wird Chrysolaminarin in nicht kristalliner Form in der zentralen Vakuole akkumuliert (Chiovitti et al. 2004), wodurch sich die Frage stellt, wie Chrysolaminarin oder Vorstufen bzw. Abbauprodukte davon in das Lumen der Vakuole im- oder exportiert werden können.

Wie über BLASTp-Analysen gezeigt, zeigen VCT3 und VCT6 Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz der Glukosetransporter VGT1 und TMT1/TMT2 aus *A. thaliana*. In diesem Modellorganismus agieren die Glukosetransporter als Proton-Antiporter und importieren Glukose oder Fruktose in die Vakuole (Wormit et al. 2004). Als Importer könnten VCT3 und VCT6 den Translokator für Chrysolaminarinderivate oder anderen Monosacchariden darstellen. Es stellt sich jedoch die Frage, ob VCT3 und VCT6 unterschiedliche Substrate transportieren oder als Im- oder Exporter fungieren. Eine quantitative real time PCR könnte hier Aufschluss über die Transportrichtung geben. Voraussetzung für eine qPCR sind verschieden behandelte *P. tricornutum*-Kulturen, die jeweils unter Lichtausschluss und in Minimalmedium, d.h. ohne Stickstoffquelle, kultiviert werden, um demensprechend Einfluss auf den Kohlenhydratmetabolismus zu nehmen. Des Weiteren muss die Frage gestellt werden (auch wenn Transporter der MFS zu sekundär-aktiven Transportern zählen), ob der Transport über diese Transporter protonenabhängig ist oder (wie der Carrier ESL1) über erleichterte Diffusionsprozesse vollzogen wird. Um dieses zu testen, könnten elektrophysiologische Messungen, z.B. mittels Patch-Clamp-Technik, hilfreich sein (Klemens et al. 2014).

Neben putativen Zuckertransportern konnten im Rahmen dieser Arbeit, wie in Kapitel 2.2.2. gezeigt, ein putativer Kaliumkanal (TPK2) sowie ein potentieller Kationen-Effluxtransporter (CAT1) als Membranproteine der Vakuole verifiziert werden. In Vertebraten kontrollieren Kaliumtransporter in der Plasmamembran von Neuronen das Ruhepotential sowie ihre elektrische Erregbarkeit. In Pflanzen ist Kalium das wichtigste Osmolyt, welches den Zellturgor aufbaut. Ein Großteil an zellulären Kalium wird in der Vakuole gespeichert, wodurch Kaliumtransporter in der Vakuole essentiell sind. Diese regulieren die Osmose von anorganischen und organischen Ionen sowie den cytosolischen pH (González et al. 2015). TPK2 ist ortholog zu dem Kaliumtransporter TPK1 aus *A. thaliana* (im Folgenden als AtTPK1 bezeichnet), der als Carrier Kalium infolge der negativen Membranpotentialdifferenz zwischen Vakuole und Cytoplasma in das Cytoplasma transportiert (Gobert et al. 2007). TPK2 besitzt zwei putative Domänen der *ion-channel superfamily*, die jeweils zwei membrandurchspannende α -Helices beinhalten, die ebenfalls in AtTPK1

identifiziert werden konnten. Analog zu AtTPK1 ist im C-terminalen Bereich eine EF-Hand-Proteindomäne vorhanden, die im Fall von AtTPK1 Calcium bindet. Es konnte gezeigt werden, dass der Transport über AtTPK1 abhängig von der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ist und diese mit zunehmend alkalischem pH des Cytosols abnimmt (Latz et al. 2007). Aufgrund der Präsenz dieser Domänen könnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei TPK2 um ein Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanal handelt.

Die Regulation von AtTPK1 erfolgt über ein 14-3-3-Protein. Bindet dieser *general regulating factor* (GRF), wird die Aktivität von AtTPK1 verstärkt (Latz et al. 2007). Das Bindemotiv für das 14-3-3-Protein (RSRSAP) befindet sich bei AtTPK1 am N-Terminus. Wird die Primärsequenz von TPK2 mit AtTPK1 verglichen fällt auf, dass TPK2 dieses RSRSAP-Motiv nicht besitzt (Abb. 38). Anhand der *eukaryotic linear motif resource* konnte neben weiteren putativen Bindemotiven für 14-3-3-Proteine, N-terminal ein putatives Interaktionsmotiv (RFRSLF) für TPK2 detektiert werden, das die Aktivität von TPK2 regulieren könnte. Es könnte auch von anderen GRFs ausgegangen werden, die möglicherweise an anderen Bereichen von TPK2 binden und somit die Aktivität regulieren könnten. Pulldown-Experimente könnten für die Suche nach Regulatorischen Proteinen von Vorteil sein.

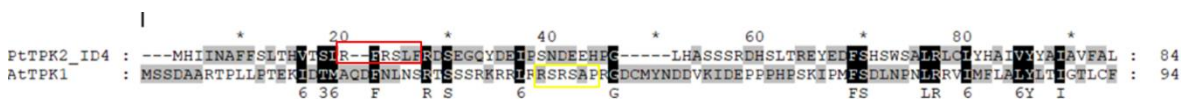


Abbildung 38: Alignment der Primärsequenzen von TPK2 aus *Phaeodactylum tricornutum* und AtTPK1 aus *Arabidopsis thaliana*. Das hochkonservierte N-terminale Bindemotiv RSRSAP für das AtTPK1-regulierende 14-3-3-Protein (in Gelb markiert) ist in TPK2 nicht vorhanden. Ein putatives Bindemotiv konnte mittels *eukaryotic linear motif resource* detektiert werden (RFRSLF, in rot markiert).

Der putative Ionentransporter CAT1 kann hingegen nicht in die Klasse der *two pore* Kaliumkanäle eingeordnet werden. CAT1 besitzt eine CzcD und eine CDF-Domäne. Die CDF-Domäne ist für den Transport von divalenten Kationen wie Kobalt, Cadmium und/oder Zink bekannt, während die CzcD-Domäne auf einen Kation-Effluxtransporter hindeutet. Schwermetalle wie Eisen sind für Redoxreaktionen von großer Bedeutung, aber auch Kupfer oder Zink sind relevant. So ist Kupfer im Elektronentransfer zwischen dem Photosystem I und II involviert und schützt vor oxidativem Stress (zusammengefasst in Martinoia et al. 2012). Hohe Konzentrationen an Schwermetallen sind jedoch toxisch und können neben Schutz vor oxidativem Stress diesen auch induzieren, wodurch die Konzentration von Schwermetallen im Cytosol streng reguliert werden muss (Martinoia et al. 2012). Transporter für nicht gebundene Schwermetalle, die in der Plasmamembran oder im Tonoplasten lokalisiert sind, sind für die Regulation der Schwermetallkonzentration im Cytosol verantwortlich (Martinoia et al. 2012). CAT1 weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu dem Schwermetalltransporter MTP1 auf, der in *A. thaliana* im Tonoplasten lokalisiert ist und dort als Zink-Effluxtransporter fungiert. Es wurde postuliert, dass in MTP1 ein Histidin-reicher hydrophiler Bereich als Sensor für

Zinkionen im Cytoplasma fungiert und vermutlich bei der Aufrechterhaltung der nicht toxischen Zinkkonzentration im Cytoplasma verantwortlich ist (Kawachi et al. 2008). Der Vergleich der Primärsequenzen von MTP1 und CAT1 zeigt, dass CAT1 ebenfalls einen Histidin-reichen Bereich sowohl am N-Terminus als auch mittig in der Sequenz besitzt (Abb. 39). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zwischen CAT1 und MPT1 kann CAT1 als Zink-Effluxtransporter postuliert werden, dessen Histidin-reichen Regionen möglicherweise die Zinkkonzentration im Cytoplasma reguliert.

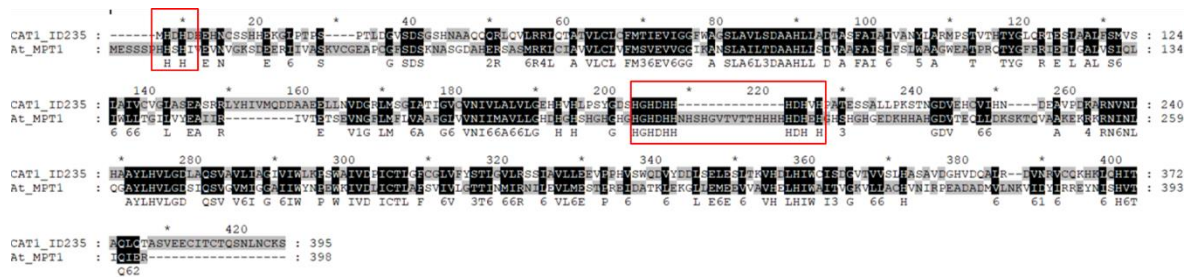


Abbildung 39: Alignment der Primärsequenzen von CAT1 aus *Phaeodactylum tricornutum* und MTP1 aus *Arabidopsis thaliana*. Sowohl MTP1 und CAT1 weisen histidinreiche Regionen in der Primärsequenz auf, die für die Regulation der cytoplasmatischen Zinkkonzentration von essentieller Bedeutung sind (Kawachi et al. 2008). Histidinreiche Regionen sind mit roten Rahmen markiert.

Sekundärmetabolite können zum einen von ABC-Transporter über Membranen transportiert werden (Martinoia et al. 2012), zum anderen sind Transporter, die der MATE-Transporterfamilie angehören, ebenfalls für den Transport von Sekundärmetaboliten bekannt. Sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten sind MATE-Transporter, neben dem Transport von Sekundärmetaboliten, für die Ausbildung von *multidrug*-Resistenzen verantwortlich sind (Omote et al. 2006). Die Substrate dieser Transporterfamilie belaufen sich auf Sekundärmetabolite wie Phenole und Alkaloide und Anthocyaninen in Pflanzen, aber auch Chloridionen (Martinoia et al. 2012; Zhang et al. 2017). In der Gruppe der Mammalia konnten MATE-Transporter hauptsächlich in der Leber und Nieren detektiert werden, wo diese in die Ausscheidung von toxischen, organischen Kationen sowie kationische Medikamenten involviert sind (Otsuka et al. 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten über das gerichtete Screening (s. Kap. 2.1) vier putative MATE-Transporter identifiziert werden, wovon MATE1-eGFP eindeutig in der Vakuolenmembran lokalisiert werden konnte (s. Abb. 11). MATE1 weist eine Sequenzähnlichkeit zu dem MATE-Transporter TT12 aus *A. thaliana* auf, der als Flavonoid/H⁺-Antiporter postuliert wurde (Marinova et al. 2007). Da Flavonoide als sekundäre Pflanzenstoffe bekannt sind, ist es unwahrscheinlich, dass MATE1 dasselbe Substrat wie TT12 transportiert. Als Sekundärmetabolite sind in Diatomeen 4 α -Methylsterole sowie Polysaccharide und Eicosapentaensäure (EPA), eine ungesättigte Fettsäure, bekannt (Pietra 1997). Möglicherweise wird eines dieser Sekundärmetabolite transportiert. MATE1 könnte auch als Transporter für organische Kationen oder Chloridionen fungieren. Durch

elektrophysiologische Messungen könnten hier zur Bestimmung der Ionenspezifität von MATE1 hilfreich sein.

Weitere Proteine, die in der Vakuolenmembran als eGFP-Fusionsprotein detektiert werden konnten, sind CBS, VTC2 und 45961. CBS besitzt neben der CorC_HylC Domäne, die zwei *tandem repeats* der Cystathionin β -Synthase (CBS) beinhaltet, eine Proteindomäne mit unbekannter Funktion (DUF). Die CorC_HylC-Domäne wurde in Na^+/H^+ -Antiportern und in Proteinen detektiert, die im Magnesium oder Cobalt-Efflux involviert sind, wodurch CBS für den Transport von Ionen essentiell sein könnte. CBS *tandem repeats* können verschiedene Adenosin-Derivate, wie AMP oder ATP binden, die darauf hindeuten, dass CBS neben dem Transport von Ionen eine regulierende Rolle von Proteinen übernehmen könnte.

In vivo Lokalisationsstudien mit dem Fusionsprotein VTC2-eGFP, eine Untereinheit des *vacuolar transport chaperons*, zeigte im Gegensatz zu den in dieser Arbeit lokalisierten Vakuolenmembranproteinen ein anderes Fluoreszenzmuster. Mittels TEM konnte die Lokalisation von VTC2 jedoch in der Membran der Vakuole von *P. tricornutum* verifiziert werden (s. Abb. 10). Wie bei Speichervakuolen in Pflanzen können Vakuolen in *P. tricornutum* möglicherweise ebenfalls fusionieren, da VTC2 nur an Kontaktpunkten von zwei Vakuolenmembranen detektiert werden konnte und bekannt ist, dass solche Chaperone in *S. cerevisiae* in die Fusion von vakuolären Membranen involviert sind (Muller et al. 2002).

45961 besitzt vermutlich durch die Trypsin Serinprotease-Domäne eine Proteaseaktivität. Serin-Proteasen wirken zudem als Regulatoren für die Prozessierung von Zielproteinen, in dem sie durch ihre proteolytische Aktivität Peptidbindungen spalten (Kraut 1977). Die Substratspezifität von Serinproteasen ist abhängig von ihren aktiven Zentren, es ist jedoch bekannt, dass Serin-abhängige Proteasen Peptidbindungen spalten, die auf die Aminosäuren Arginin oder Lysin folgen (Kraut 1977).

Zusammenfassend übernimmt die zentrale Vakuole von *P. tricornutum* die Funktion eines Speicherkompartiments, das neben Chrysolaminarin vermutlich Sekundärmetabolite, Ionen wie Calcium- und Kaliumionen und Schwermetalle wie Zink speichert und ähnlich wie bei Pflanzen eine Rolle bei der Detoxifizierung sowie bei der Regulierung des cytoplasmatischen pH-Wertes und der Osmose von Ionen übernimmt (Abb. 37). Möglicherweise dient die zentrale Vakuole auch als lytisches Kompartiment, das im Folgenden näher diskutiert wird.

3.1.2.1 Die Funktion der zentralen Vakuole von *Phaeodactylum tricornutum* – auch ein lytisches Kompartiment?

Vakuolen und Lysosomen eukaryotischer Zellen übernehmen die Degradation von Makromolekülen und besitzen aufgrund von Protonenpumpen ein acides Milieu (zusammengefasst in Marty 1999). Durch Proteomanalysen, die mit Material aus isolierten Vakuolen von *A. thaliana* durchgeführt wurden, konnte ein aussagekräftiger Datensatz von Proteinen analysiert werden (Carter et al. 2004). So konnten Membranproteine wie MATE-Transporter, Transporter der MFS-Familie, ABC-Transporter und Untereinheiten der V-ATPasen und auch luminal Proteine wie Glykosidasen, Proteasen und Proteine, die relevant für Membranfusionen sind, detektiert werden (Carter et al. 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch ein gezieltes Screening drei putative luminal Proteine lokalisiert werden (s. Kap. 2.2.4), die für den Kohlenhydratmetabolismus in *P. tricornutum* relevant sein könnten (Kroth et al. 2008). Während die Fusionsproteine der Peptidase1 und β -GLYC2, exprimiert als eGFP-Fusionsprotein, ein unspezifisches Muster zeigten, konnte β -GLYC1-eGFP in der Membran der zentralen Vakuole detektiert werden (s. Abb. 14). Die Lokalisation von β -GLYC1 war unerwartet, da das bioinformatische Tool zur Vorhersage von putativen Transmembrandomänen keine potentiell membrandurchspannenden α -Helices detektierte. Für eine bessere Vorhersage von Transmembrandomänen wurden insgesamt 13 verschiedene bioinformatische Tools verwendet, die unterschiedliche Ergebnisse lieferten (s. Tab. 30). Das Ergebnis dieser Analysen war, dass β -GLYC1 und Peptidase1 möglicherweise membranständige Proteine sind, während β -GLYC2 höchstwahrscheinlich als lösliches Protein vorliegt. Wie in 2.2.4.2 dargestellt, konnten für die Fusionsproteine der Glykosidasen und der Peptidase1 mittels Carbonatextraktionen Untersuchungen zur Membranintegrität der genannten Proteine gemacht werden (s. Abb. 16). Es konnte anhand dessen gezeigt werden, dass es sich bei β -GLYC1-eGFP und Peptidase1-eGFP tatsächlich um Membranproteine handelt. Dennoch konnte ein signifikanter Teil an Fusionsproteinen in der löslichen Fraktion detektiert werden. Da der Marker für die integrale Fraktion ebenfalls in der löslichen Fraktion detektiert werden konnte, kann hier möglicherweise von einer starken Überexpression der Fusionsproteine ausgegangen werden, wodurch eine sterische Hinderung der Membranintegration der untersuchten eGFP-Fusionsproteine durch das fusionierte eGFP zustande kommen könnte. Die Immunogold-Markierungen mit anschließender Visualisierung am Elektronenmikroskop widersprechen wiederum dem Ergebnis der Carbonatextraktion von dem Fusionsprotein Peptidase1-eGFP. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Lokalisierung von Peptidase1-eGFP im Lumen der zentralen Vakuole (s. Abb. 15A). Dies könnte mit der Überexpression des Fusionsproteins zusammenhängen, das durch die sterische Hinderung nicht mehr in die Membranintegriert werden kann und zum Abbau in die

Vakuole dirigiert wurde. Auf Basis der Carbonatextraktion mit β -GLYC2-eGFP konnte keine eindeutige Aussage über die Membranintegrität getroffen werden (s. Abb. 16). In der löslichen Fraktion konnte eine weitere Bande bei ca. 30 kDa detektiert werden, die der Größe von eGFP entsprechen könnte. Auch hier wurde aufgrund der nicht eindeutigen Lokalisation des Fusionsproteins eine Immunogold-Markierung mit anschließender Visualisierung am Elektronenmikroskop durchgeführt. Die Immunogold-Markierung ergab eine Lokalisation im Lumen der Vakuole (s. Abb. 15B). Allerdings wurde das Fusionsprotein β -GLYC2-eGFP im Gegensatz zur Lokalisation der Peptidase1 in definierte Bereiche innerhalb des Lumens detektiert. Die Immunogold-Markierung in Verbindung mit der zusätzlich detektierten Bande in der löslichen Fraktion der Carbonatextraktion deutet darauf hin, dass hier nicht das komplette Fusionsprotein in der Vakuole detektiert werden konnte, sondern nur eGFP. Die Zentrierung der Immunogold-Markierung des vermeintlichen Fusionsproteins von β -GLYC2 ähnelt zu dem der Immunogold-Markierung von MATE2-eGFP (s. Abb. 11B). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass auch im Fall vom MATE2-eGFP nur ein Teil des Fusionsproteins (nämlich eGFP) in der Vakuole detektiert wurde. Anhand der Immunogold-Markierungen der Fusionsproteine kann vermutet werden, dass die zentrale Vakuole eine lytische Funktion in *P. tricornutum* einnimmt. Die auffällige punktuelle Konzentration der vermeintlichen Fusionsproteine könnte auf eine Kompartimentierung innerhalb der Vakuole hindeuten. Zwar scheinen in der Vakuole selbst die Reaktionsräume nicht wie beispielsweise in Plastiden durch Membranen voneinander getrennt zu sein, dennoch könnten Reaktionsräume mit ähnlicher Trennung wie im Nukleus auftreten. Der nukleare Raum ist in verschiedenste Reaktionsräume aufgeteilt, in dem die Prozesse hinsichtlich der Genomaktivität stattfinden (Gavrilov und Razin 2015). Ein Subkompartiment im Nukleus ist als eine Region definiert, in der ein gewisser Teil an Makromolekülen hoch konzentriert vorliegt (zusammen gefasst in Gavrilov und Razin 2015). In Bezug auf die Vakuole ist die elektronendichtere Region in der elektronenmikroskopischen Aufnahme möglicherweise der Reaktionsraum, der eine höhere Konzentration an Peptidasen und Hydrolasen besitzt.

3.2 Der Proteintransport in die zentrale Vakuole von *Phaeodactylum tricornutum*

Die *in vivo* Lokalisationsstudien dieser Arbeit konnten das vakuoläre Proteom von *Phaeodactylum tricornutum* von vier (Liu et al. 2016; Huang et al. 2016) auf 13 Membranproteine erweitern. *In silico* Analysen lassen dennoch weitaus mehr Proteine in der Vakuole vermuten. Durch die Lokalisationen können Vermutungen angestellt werden, welche Funktion die zentrale Vakuole neben der Speicherung von Chrysolaminarin in *P. tricornutum* besitzt. Die generierten Daten bieten die

Möglichkeit weitere Kenntnisse über die Funktion der Vakuole zu sammeln und Aussagen über die Physiologie der Transportproteine zu treffen.

Neben der Lokalisation von vakuolären Membranproteinen wurden im Zuge dieser Arbeit die Mechanismen des Proteintransports von Membranproteinen in die zentrale Vakuole von *Phaeodactylum tricornutum* untersucht und putative Targetingmotive identifiziert. Hierzu liegen bis dato zwei Publikationen vor, in denen zum einen Gene für *vacuolar sorting receptors* im Genom von *P. tricornutum* phylogenetisch untersucht wurden, zum anderen zwei 1,6 β -Transglykosylasen in der Vakuolenmembran lokalisiert wurden, die *in silico* auf mögliche Targetingsequenzen, wie Tyrosin- und Dileucinmotive, untersucht wurden (Becker und Hoef-Emden 2009; Huang et al. 2016).

3.2.1 Ist *Phaeodactylum tricornutum* Wortmannin und Brefeldin A-resistent?

Der Transport von Proteinen über das Endomembransystem kann mittels verschiedener Inhibitoren untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit Brefeldin A und Wortmannin hinsichtlich des Proteintransports durchgeführt (s. Kap. 2.3.1.). Brefeldin A stabilisiert transient die Interaktion zwischen ARF1 und dem *guanidine-nucleotide exchange factor* (GEF). Folglich können die COPI-Hüllproteine nicht mehr an die Membran rekrutiert werden, wodurch der retrograde Transport zwischen Golgi-Apparat und ER stagniert (Donaldson et al. 1992b). Der Golgi-Apparat kollabiert, während Proteine nicht über das EMS transportiert werden können und im ER akkumulieren (Donaldson et al. 1992a; Donaldson et al. 1992b). Wortmannin inhibiert hingegen die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PIK3), wodurch das Protein- Recycling von PVCs und MVBs nicht mehr gewährleistet ist und das Transgolgi-Netzwerk anschwillt (Wang et al. 2009). Versuche sowohl mit Brefeldin A als auch Wortmannin in *P. tricornutum* blieben im Rahmen dieser Arbeit erfolglos. Es konnte jedoch in anderen Studien gezeigt werden, dass der Transport von plastidären Proteinen in *P. tricornutum* mittels BFA blockiert wurde (Kilian und Kroth 2005). Dadurch wurde vermutet, dass ein vesikulärer Transport in der komplexen Plastide stattfinden könnte. Warum sowohl BFA als auch Wortmannin keinen Effekt auf den Transport von vakuolären Proteinen zeigt, kann unterschiedlich interpretiert werden. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Inhibitor-Konzentrationen getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ bereits toxisch für die Zelle wirkt, so dass nach 24 h keine Fluoreszenz der eGFP-Fusionsproteine mehr detektiert werden konnte (s. Kap. 7.3). Niedrigere Konzentrationen von Wortmannin und Brefeldin A zeigten hingegen keinen Effekt, so dass sich das Fluoreszenzmuster von vakuolären Fusionsproteinen nicht verändert hat. Es ist bekannt, dass manche Membranproteine wie z.B. TIP3.1 aus *A. thaliana* nicht über den Golgi-Apparat zur Vakuole transportiert werden, sondern nach der Inserierung in das ER über *precursor accumulating compartments* (PAC) zur Vakuole gelangen (Park et al. 2004; Rojas-Pierce 2013). Dass alle getesteten Proteine (VCT3, CBS, TIP1 und ABC3) über

den Golgi-unabhängigen Weg zur Vakuole dirigiert werden, ist jedoch unwahrscheinlich, da sowohl Wortmannin als auch BFA ebenfalls keinen Einfluss auf die Lokalisation von Plasmamembranproteinen hat (Positivkontrolle). Zudem ist es wahrscheinlicher, dass Proteine, wie die hier verwendeten Plasmamembranproteine, mit N-terminaler Zielsteuerungssequenz über den sekretorischen Weg transportiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass *Plasmodium falciparum*, ein Vertreter der Apikomplexa, durch eine Punktmutation in der Sec7-Domäne des GEF eine BFA-Resistenz ausbildet (Baumgartner et al. 2001). In der Genomdatenbank von *Phaeodactylum tricornutum* konnten mehrere Genmodelle für putative Phosphatidylinositol-3-Kinasen als auch vier putative Genmodelle für GEFs mit einer Sec7-Domäne identifiziert werden (Abb. 40). Die Region, die für die BFA-Sensibilität verantwortlich ist, konnte in allen Proteinen identifiziert werden. Die Aminosäureabfolge IMLNT ist in dieser Region hoch konserviert. Die BFA-resistente *F. falciparum* Linie weist eine Punktmutationen in diesem Motiv auf (IILNT) (Baumgartner et al. 2001). Da diese Mutation in keiner der GEFs aus *P. tricornutum* vorkommt, kann vermutet werden, dass BFA die putativen GEFs inhibieren kann. Ob die identifizierten GEF auch tatsächlich für den COPI-abhängigen Vesikeltransport relevant sind, bleibt jedoch ungeklärt.

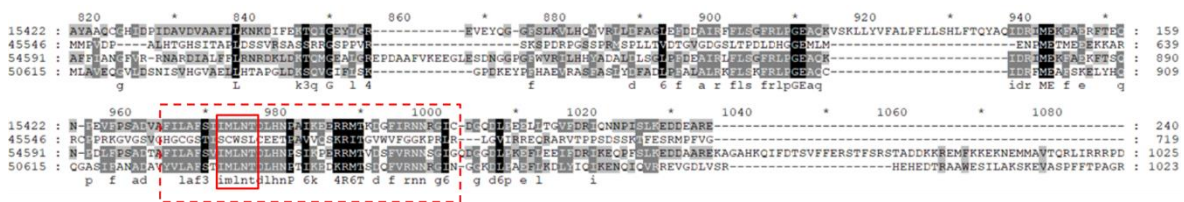


Abbildung 40: Ausschnitt der Primärsequenzen der putativen *guanidine-nucleotide exchange factors* (GEFs) aus *P. tricornutum*. Das Alignment zeigt die Sec7-Domäne vier putativen GEFs (ID 15422, ID 45546, ID 54591 und ID 50615). Die Region, die für eine Inhibierung durch BFA relevant ist, ist in allen GEF vorhanden (rot gestrichelte Markierung). Das hochkonservierte Motiv IMLNT besitzt keine Punktmutation, wodurch eine BFA-Resistenz ausgeschlossen werden kann.

Vermutlich korreliert die Resistenz von BFA und Wortmannin mit der Expressionszeit der Fusionsproteine, wodurch eine mögliche Veränderung der Lokalisation erst in einem Zeitintervall auftreten würde, in dem die Zellen schon ihre Lebensfähigkeit verloren haben könnten.

3.2.2 Tyrosin- und Dileucinmotive sind für den vakuolären Transport essentiell

Das intrazelluläre *targeting* von Proteinen zu ihren Wirkungsorten konnte in vorangegangenen Arbeiten bereits in *P. tricornutum* untersucht werden. So wurde beispielsweise das Proteintargeting in die Subkompartimente der Komplexen Plastide näher betrachtet (Kilian und Kroth 2005; Hempel et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste Daten für den vakuolären Proteintransport in Diatomeen generiert werden. Zur Untersuchung des kanonischen, sekretorischen Wegs wurden zunächst eine Untereinheit eines ABC-Transporters (ABC3) und ein Membranprotein mit einer CBS-Domäne (CBS) hinsichtlich ihrer vorhergesagten N-terminalen Zielsteuerungssequenzen untersucht (s. Kap. 2.4.2.1). Durch Deletionen der vorhergesagten Signalpeptide konnte gezeigt werden, dass

CBS für den Transport über den sekretorischen Weg das Signalpeptid benötigt, während das Fusionsprotein von ABC3 keine Veränderung in der vakuolären Lokalisation zeigte (s. Abb. 17) und wahrscheinlich die erste Transmembrandomäne für die Inserierung in die ER-Membran verantwortlich ist (Lodish et al. 2000).

Da in anderen eukaryotischen Organismen Dileucin- und Tyrosinmotive eine Rolle im intrazellulären Transport zur Vakuole einnehmen (Bonifacino und Traub 2003), wurden in den Primärsequenzen der *in vivo* lokalisierten vakuolären Membranproteinen C-terminal und N-terminal nach putativen Targetingsignalen gesucht (Tab. 11).

Tabelle 11: Übersicht der untersuchten Tyrosin- und Dileucinmotiven der *in vivo* lokalisierten Proteine aus *Phaeodactylum tricornutum*.

Untersuchtes Protein	Targetingmotiv	N- oder C-terminal	Neue Lokalisation
CBS	EGTPLL	C-terminal	Plasmamembran
ABC3	DQLL	C-terminal	unspezifisch
TIP1	YGSI	N-terminal	unspezifisch
VCT3	EAQPLL	N-terminal	ER ?
	YQAV	/	Plasmamembran
TPK2	YDEI	N-Terminal	cER
45961	YGSI	C-Terminal	Plasmamembran

Aufgelistet wurden die untersuchten Membranproteine sowie ihre putativen Targetingmotive und ihre Lokalisation nach Modifizierung des putativen Motivs.

Für CBS konnte anhand der Deletion des C-Terminus nachgewiesen werden, dass dieser für den Transport von essentieller Bedeutung ist, da das verkürzte Protein in die Plasmamembran dirigiert wurde (s. Abb. 19). In Pflanzen werden lösliche Proteine, die kein spezifisches Targetingsignal besitzen, in den extrazellulären Raum sekretiert, für Membranproteine scheint die Plasmamembran bei Abwesenheit von spezifischen Targetingsequenzen die Zielmembran zu sein (Chrispeels 1991; Wolfenstetter et al. 2012). Nach genauerer Betrachtung des C-Terminus konnte zudem ein putatives Dileucinmotiv (EGTPLL) identifiziert werden, das anhand von Aminosäureaustauschmutanten auch als funktionelles Targetingsignal verifiziert werden konnte (s. Abb. 19). Dass der C-Terminus einschließlich des Dileucinmotivs tatsächlich für den Transport in die Vakuole verantwortlich ist, konnte zusätzlich durch die Fusion des C-Terminus von CBS an ein Plasmamembran-lokalisiertes Protein (PIP1) gezeigt werden (s. Abb. 20). Für weitere Chimära (PDZ2-CBS) war es dennoch nicht möglich, diese in die Vakuolenmembran zu dirigieren. Grund hierfür könnte die Distanz zwischen Dileucinmotiv und Transmembrandomäne sein, die ebenfalls für den Transport relevant sein kann (Geisler et al. 1998). Eine weitere Erklärung wären endogene Targetingsignale des Plasmamembranproteins PDZ2, welche dieses in die Plasmamembran dirigieren. Anhand der Daten ist es wahrscheinlich, dass CBS über den sekretorischen Weg vermutlich über COPII-Vesikel vom ER zum Golgi-Apparat und zum TGN transportiert zu werden. Im späten sekretorischen Weg sollte demnach das verifizierte Dileucinmotiv mit einer Untereinheit eines

Adapterprotein-Komplexes interagieren und dadurch für den weiteren Transport in die Vakuole Clathrin zu rekrutieren. *In vivo* Interaktionsstudien mit der μ -Untereinheit der AP-Komplexe 1-4 zeigten jedoch keine Interaktion (Daten nicht gezeigt). Es wäre möglich, dass das Dileucinmotiv tatsächlich nicht mit einer μ -Untereinheit interagiert und andere Untereinheiten der AP-Komplexe dadurch in Frage kämen, da es aber bis dato nicht möglich gewesen ist *in vivo* Interaktionen zwischen den AP-Untereinheiten und ihren Interaktionspartnern zu zeigen, bleibt diese Frage ungeklärt. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der Transport über CCV nicht über AP-Komplexe vermittelt wird. *In vitro* Interaktionsstudien könnten hier weitere Anhaltspunkte über den späten sekretorischen Weg geben. Eine Mutation des putativen Tyrosinmotivs im C-terminalen Bereich von 45961 zeigte ebenfalls eine Inserierung des Fusionsproteins in die Plasmamembran oder Zellperipherie (s. Abb. 24), wodurch der intrazelluläre Transport mit dem Transportmechanismus von CBS gleichzustellen werden könnte. Die Modifizierung des putativen das Dileucinmotivs (DQLL) von ABC3 am C-Terminus zeigt im Gegensatz zu CBS und 45961 eine unspezifische Lokalisation (s. Abb. 18). Diese unspezifische Lokalisation könnte innerhalb des EMS liegen. Es ist bekannt, dass nicht alle Proteine, dessen vakuoläres Targetingsignal fehlt, zur Plasmamembran dirigiert werden, sondern durchaus auch in vesikulären Strukturen, im TGN oder im ER akkumulieren (Brandizzi et al. 2002). Die veränderte Lokalisation des putativen Targetingmotivs von ABC3 weist darauf hin, dass diese möglicherweise für das intrazelluläre *targeting* zur Vakuolenmembran eine Rolle spielen könnte. Es könnte aber auch sein, dass mehrere solcher Motive gebraucht werden, um die Kompartimente des Endomembransystems zu durchlaufen. Der Zuckertransporter VCT3 besitzt N-terminal ein putatives Dileucinmotiv (EAQPLL). Bei einem Austausch der für das Targetingmotiv relevanten Aminosäuren, wird VCT3 nicht in die Membran der Vakuole inseriert, sondern scheint im ER zu akkumulieren (s. Abb. 25A). Wird jedoch das putative Tyrosinmotiv (YQAV) mutiert, konnte das Fusionsprotein von VCT3 in der Plasmamembran detektiert werden (s. Abb. 25A). Eine Mutation beider putativen Targetingmotive führte jedoch wieder zu einer Lokalisation im ER. Folglich könnte das hier vermeintliche Dileucinmotiv für den Export aus dem ER verantwortlich sein, während das Tyrosinmotiv für den spät sekretorischen Weg von essentieller Bedeutung sein könnte. Es ist bekannt, dass ER-Exportsignale häufig am C-Terminus auftreten und entweder di-acidisch, di-basisch oder di-aromatisch sind (Nishimura und Balch 1997; Nufer et al. 2002; Giraudo und Maccioni 2003). Zudem sind diese Exportsignale in unmittelbarer Nähe einer Transmembrandomäne. Wird der N-Terminus von VCT3 genauer betrachtet, könnte die saure Aminosäure des putativen Dileucinmotivs ebenfalls zu einem putativen di-acidischen [D/E]X[D/E] ER-Exportsignal (DEE) gehören (s. Abb. 25B). Aufgrund der Tatsachen, dass dieses putative ER-Exportsignal weder C-terminal, in unmittelbarer Nähe einer Transmembrandomäne (zwischen putativen ER-Exportsignal und Transmembrandomäne liegen 38

AS) lokalisiert ist (Nufer et al. 2002) noch über die *eukaryotic linear motif resource* als solches annotiert wurde, ist es unwahrscheinlich, dass die Aminosäureabfolge „DEE“ als ER-Exportsignal fungiert. Zur experimentellen Überprüfung wurde ein eGFP-Konstrukt generiert, bei dem nur die Dileucine des putativen Dileucinmotivs gegen Alanin substituiert wurden (EAQPAA), allerdings war es nicht möglich das Fusionsprotein VCT3_LI/AA-eGFP im Rahmen dieser Arbeit fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen.

Ein weiteres Beispiel für ein *targeting* mithilfe von mehreren Dileucin- oder Tyrosinmotiven stellt der Kaliumtransporter TPK2 dar. Die Mutation eines putativen Tyrosinmotivs führte zu einer Lokalisation ausschließlich im cER (s. Abb. 26). Tyrosinmotive sind neben ER-Exportsignalen in Proteinen von *S. cerevisiae* ebenfalls in der Lage mit COPII-Vesikeln zu interagieren (Sato und Nakano 2002). Warum das Fusionsprotein TPK2-Y/A_L/A-eGFP jedoch nur im cER detektiert werden konnte ist fraglich. Des Weiteren wurden weitere putative Targetingmotive analysiert, dessen Mutationen jedoch für den Transport in die Vakuole irrelevant sind (s. Abb. 26). Über die *eukaryotic linear motif resource* wurden neben den bereits untersuchten putativen Tyrosinmotiven keine weiteren Tyrosin- oder Dileucinmotive vorhergesagt. Möglicherweise sind neben dem putativen Tyrosin-ER-Exportsignal für den Transport von TPK2 unbekannte vakuoläre Targetingmotive essentiell, die in fortführenden Arbeiten identifiziert werden könnten.

3.2.3 Ist das Tyrosinmotiv „YGS1“ charakteristisch für den vakuolären Proteintransport in *Phaeodactylum tricornutum*?

Das putative Tyrosinmotiv „YGS1“ konnte in zwei Proteinen (TIP1 und ABC3) vorhergesagt werden. Dies führte zu der Annahme, dass möglicherweise dieses putative Tyrosinmotiv in *P. tricornutum* in weiteren vakuolären Membranproteinen konserviert ist. Zur Überprüfung der Hypothese wurde über eine gezielte BLASTp-Analyse nach Proteinen in der Genomdatenbank gesucht, die die Sequenzabfolge „YGS1“ in der Primärsequenz besaßen (s. Kap. 2.1). Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei Kandidaten des „YGS1-BLAST“ *in vivo* lokalisiert werden, wovon 45961, ein Protein mit einer Serinprotease-Domäne, tatsächlich in der Vakuolenmembran lokalisiert werden konnte, während die Fusionsproteine für 47060 und 44950 unspezifische Fluoreszenzmuster zeigten (s. Abb. 13). Die unspezifischen Lokalisationen von 47060-eGFP und 44950-eGFP zeigen, dass das putative Tyrosinmotiv keine Relevanz für den Transport zur Vakuole besitzt. Dieselbe Aussage kann ebenfalls für ABC3 getroffen werden. Der Austausch der für das Tyrosinmotiv relevanten Aminosäuren gegen Alanin hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation des Fusionsproteins ABC3-Y/A_L/A-eGFP (s. Abb. 18). Die Aminosäureaustausch-Mutanten von TIP1 und 45961 hingegen zeigten jeweils, exprimiert als eGFP-Fusionsprotein, abweichende Fluoreszenzstrukturen. Während TIP1-Y/A_L/A-eGFP eine partielle Lokalisation im cER zeigt (s. Abb. 22), resultierte der

Aminosäureaustausch von 45961 (45961-Y/A_I/A-eGFP) in einem Fluoreszenzmuster, das auf eine Lokalisation in der Plasmamembran hindeutet (s. Abb. 24). Für membranständige Proteine, könnte das Tyrosinmotiv, vorausgesetzt, dass dieses in einer cytoplasmatischen Region des Membranproteins und N- oder C-terminal vorhanden ist, ein Indiz für eine Lokalisation in der Vakuolenmembran sein. Dennoch ist das Vorhandensein dieses Tyrosinmotivs kein eindeutiger Beweis für eine Lokalisation in der Vakuolenmembran. Um zu beweisen, dass die Aminosäuresequenzabfolge „YGSI“ als Tyrosinmotiv relevant für den vakuolären Transport ist, sollten hier weitere Proteine mit diesem putativen Targetingsignal *in vivo* lokalisiert werden.

3.3 Ein verkürzter *vacuolar sorting receptor* sekretiert in den extrazellulären Raum

Der Transport von luminalen Vakuolenproteinen erfolgt über Rezeptoren, wie in Pflanzen die *vacuolar sorting receptors*, die zum einen die Sortierung der Cargoproteine im Trans-Golgi-Netzwerk übernehmen und zum anderen den Transport vom TGN über PVC zur Vakuole vermitteln (Shen et al. 2013). Relevant für das Binden der Cargoproteine ist der N-terminale Bereich des Typ1-Membranproteins, wohingegen der C-terminale Bereich häufig ein Tyrosinmotiv besitzt, der für den Transport der Cargoproteine über *clathrin coated vesicles* (CCV) essentiell ist (Happel et al. 2004; Luo et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass modifizierte VSRs, d.h. VSRs ohne Transmembrandomäne und C-Terminus, in den extrazellulären Raum samt ihrer Cargos sekretiert werden können (Shen et al. 2013). Dieses hat den Vorteil, dass über Massenspektroskopie mögliche Interaktionspartner der Rezeptoren verifiziert werden können, zum anderen kann eine Lokalisation über Fusionsproteine umgangen werden. Analog zu den Versuchen in Protoplasten wurde die Untersuchung auf Sekretion der modifizierten VSRs in *P. tricornutum* durchgeführt. Wie in 2.4.1. gezeigt, veränderte sich die Lokalisation der Fusionsproteine ptVSR1-3 nach der Deletion der jeweiligen putativen Transmembrandomänen (s. Abb. 17). Durch Carbonatextraktionen konnte die Deletion der Transmembrandomäne verifiziert werden, wodurch die Untersuchung auf Sekretion gewährleistet wurde (s. Abb. 18). So konnten in den aufkonzentrierten Nährmedien einer VSR1ΔTMD-His und VSR2ΔTMD-His exprimierenden *P. tricornutum*-Kultur neben den bereits sekretierten Phosphatasen (Lin et al. 2013), mehrere Banden auf einem Instant Blue gefärbten SDS-Gel visualisiert werden (s. Abb. 19). Über massenspektroskopische Analysen konnte gezeigt werden, dass VSR1ΔTMD tatsächlich in den extrazellulären Raum sekretiert wurde. Neben dem identifizierten verkürzten Rezeptor, konnten insgesamt drei Proteine über massenspektroskopische identifiziert werden (s. Tab. 10). Ein Protein, ISIP2a, ist für die Konzentrierung von Eisen an der Zelloberfläche verantwortlich und ermöglicht die Aufnahme von Eisen (Morrissey et al. 2015). Es ist unwahrscheinlich, dass ISIP2a ein möglicher Ligand von einem

VSR darstellt, da für dieses zusätzlich eine Transmembrandomäne vorhergesagt wird. Ein Protein besitzt aufgrund ihrer vorhergesagten Proteindomänen möglicherweise eine hydrolytische Aktivität, allerdings konnten für die identifizierten Proteine keine bekannten *vacuolar sorting determinants* (VSDs) identifiziert werden. Es könnte dennoch sein, dass die im Medium identifizierten Proteine VSDs besitzen, die möglicherweise Organismus-spezifisch sind und ausschließlich experimentell identifiziert werden können. Das Auftreten weiterer Proteine im aufkonzentriertem Medium zeigt zusätzlich, dass die Bindedomäne für den Liganden wie bei pflanzlichen VSRs auch im N-terminalen Bereich des Rezeptors vorhanden ist. Fortführende Studien könnten Interaktionsstudien mittels Co-Immunopräzipitationen sein, um die Interaktion von putativen Liganden und Rezeptor zu verifizieren. Es könnten zu dem ebenfalls massenspektroskopische Analysen mit dem gesamten aufkonzentrierten Medium gemacht werden, um weitere putative Interaktionspartner zu identifizieren, so dass das Proteom der zentralen Vakuole als auch ihre Funktion weiter charakterisiert werden können.

3.4 Die zentrale Vakuole von *Phaeodactylum tricornutum* im evolutionären

Kontext

Die Entstehung von internalen membranumschlossenen Kompartimenten stellt eines der wichtigsten Ereignisse in der Evolution von eukaryotischen Zellen dar, während Prokaryoten generell keine membranumschlossenen Organellen besitzen. Für den Ursprung neuer Organellen in einer eukaryotischen Zelle wurden zwei Mechanismen postuliert. So sind Mitochondrien und Plastiden eindeutig aus der Endosymbiose und zwischen eines ancestralen Proteobakteriums bzw. Cyanobakteriums und einer heterotrophen Wirtszelle entstanden, die mit einer sukzessiven Reduktion des Symbionten einherging (Margulis 1970; Martin et al. 2015). In Endosymbiosen höherer Ordnung erzeugte der Prozess der Organellenentstehung weit komplexere Membrantopologien. Die Reduktion des Symbiontengenoms und der Transfer essentieller Gene des Symbionten in den Nukleus des Wirts konnten beispielsweise anhand von Untersuchungen des Nukleomorphs der Cryptophyten und Chlorarachniophyten gezeigt werden, die ein evolutionäres Zwischenstadium widerspiegeln (Greenwood et al. 1977; Hibberd und Norris 1984). Organellen autogenen Ursprungs stellen unter anderem die Kompartimente des Endomembranssystems dar, deren Evolution allerdings durch das Fehlen von intermediären Stadien dieser Kompartimente nicht eindeutig geklärt werden kann (zusammen gefasst in Cavalier-Smith 2002). Zudem wird die Entstehung der basalen eukaryotischen Merkmale vor der Divergenz des *latest common eukaryotic ancestor* (LCEA) und neu entstandenen Eukaryoten datiert (Dacks und Doolittle 2001). Dennoch wurden Theorien in Bezug auf die Entstehung des Endomembransystems aufgestellt, die ebenfalls für die Entstehung einer primitiven Vakuole gilt. Ob ein solch lysosomales Kompartiment, wie in

Pflanzen, bereits ein stabiles Organell darstellt ist fraglich. Eine Vakuole als fest etabliertes Organell ist im Laufe der Evolution beispielsweise in Bezug auf die Detoxifizierung der Zellen von Vorteil. Manche Organismen, wie Pflanzen, sind sessil und Toxinen oder Schwermetallen ausgesetzt, die entweder in kristalliner Form oder als Polymere in der Vakuole gelagert werden und somit osmotisch nicht mehr aktiv sind bzw. enzymatisch abgebaut werden (Martinoia et al. 2007).

Die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* gehört zu der Gruppe der Heterokontophyta, die laut der Chromalveolatenhypothese auf ein monophyletisches Ereignis sekundärer Endosymbiose schließen lassen könnte (Cavalier-Smith 1999). Ausgehend von der Theorie, dass sowohl die eukaryotische Wirtszelle als auch der internalisierte Endosymbiont, die Rhodophyte, bereits jeweils ein Endomembransystem einschließlich einer (primitiven) Vakuole/Lysosom besaßen (Barlow und Dacks 2017), ist sowohl der Ursprung als auch das Proteom der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* von besonderem Interesse. Viele Faktoren, die in eukaryotischen Zellen den Transport über das Endomembransystem vermitteln, wie SNARE-Proteine, Rab-GTPasen oder Komponenten des Coatomers, sind ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorhanden und wurden vermutlich vor der Divergenz des LCEA etabliert (Dacks et al. 2008). Genduplikationen und eine Koevolution der Faktoren, die mit SNARE-Proteinen, Rab-GTPasen oder Coatomeren interagieren, trugen zu der evolutionären Differenzierung und zur Spezialisierung der Einheiten des EMS bei. (Dacks et al. 2009)

Die Lokalisationsstudien dieser Arbeit haben gezeigt, dass ein großer Teil der zu *A. thaliana* homologen Proteine in der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* lokalisiert sind (s. Abb. 37). Anhand der vakuolär-lokalisierten Proteine wurden als Vorversuch phylogenetische Analysen durchgeführt. Hierbei wurden homologe Sequenzen der Amoebozoa, Ophisthokonta, Viridiplantae, Rhodophyta, Cryptophyta, Haptophyta und Vertreter der SAR-Klade berücksichtigt. Bei den vorläufigen phylogenetischen Analysen zeigten die Proteine 45961, VCT6, TPK2, TIP1, MATE2, ABC3 und Peptidase1 keine Tendenz bezüglich der Verwandtschaftsbeziehung (s. Abb. 45-51). Auffällig ist jedoch, dass über BLAST-Analysen für β -GLYC1 (s. Abb. 52) keine homologen Proteine im Taxon der Rhodophyta gefunden werden konnte, was sich zum einen durch den Mangel an vollständig sequenzierten Genomen von Rotalgen erklären ließe. Zum anderen könnte dies auch ein Indiz dafür sein, dass Rhodophyten keine zu β -GLYC1 homologen Proteine besitzt, wodurch ein rhodophytischer Ursprung von β -GLYC1 vorläufig ausgeschlossen wäre. Vorläufige phylogenetische Berechnungen für die Proteine β -GLYC2, CAT1, CBS, MATE1, VCT3 und VTC2 ließen eine Tendenz zur Herkunft dieser Proteine zu (s. Abb. 52-57). Es konnte gezeigt werden, dass β -GLYC2 neben weiteren Proteinen aus der Gruppe der Stramenopilen eine Schwestergruppe zu den Amoebozoen bildete, während MATE1 und VCT3 eine nähere Verwandtschaft zu den Ophisthokonta zeigten (Tab.

12). CBS und VTC2 bildeten eine Schwestergruppe zu den Rhodophyta, während CAT1 eine Verwandtschaft mit der Gruppe der Viridiplantae, spezifischer mit den Chlorophyten, zeigte.

Tabelle 12: Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen der phylogenetisch untersuchten Proteinsequenzen von *P. tricornutum*.

Protein	Amoebozoa	Ophisthokonta	Rhodophyta	Chlorophyta
β-GLYC1	+			
CAT1				+
CBS			+	
MATE1		+		
VCT3		+		
VTC2			+	

+ = bildet eine Schwestergruppe zu der Klade der Stramenopilen.

Möglicherweise ist die zentrale Vakuole von *P. tricornutum* ein wirtsspezifisches Organell, das bereits vor der Internalisierung einer Rhodophyte die Proteine MATE1 und VCT3 besaß. Dies ließe sich ebenfalls mit dem Ursprung der V-ATPase erklären, die als ATPase archaischen Ursprungs postuliert wurde (Mulkidjanian et al. 2007). Bis dato konnten keine V-ATPasen in der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* lokalisiert werden, was phylogenetische Analysen für spezifische vakuoläre ATPasen erschwert. Für weitere Analysen sollten ATPasen von *P. tricornutum* näher untersucht werden, um die Theorie zu stützen.

Das Vorhandensein von Proteinen rhodophytischen Ursprungs könnte mit dem sekundären Endosymbioseereignis erklärt werden. So besitzen sowohl der Endosymbiont als auch die Wirtszelle bereits lysosomale Kompartimente mit spezifischen Membranproteinen, die jeweils relevant für deren metabolischen und physiologischen Funktionen sind. Durch die Internalisierung des Endosymbionten von der Wirtszelle kam es zu einer drastischen Reduzierung der endosymbiontischen zellulären Strukturen, die ebenfalls mit der Reorganisation der symbiontspezifischen Gene (Reduzierung des Symbiontengenoms und Transfer der symbiontspezifischen Gene in den Wirtsnukleus) einhergingen (Stoebe und Maier 2002). Vakuoläre Proteine rhodophytischen Ursprungs, die durch EGT im Genom des Wirts codiert sind, werden exprimiert und in das lysosomale Kompartiment transportiert. Wird angenommen, dass sämtliche Proteine, die für den Transport entlang des EMS ubiquitär vorhanden sind (Dacks et al. 2008) und vermutlich auch einige Targetingmotive entlang eukaryotischer Linien konserviert sind (Bonifacino und Traub 2003), wäre der Transport von CBS zum lysosomalen Kompartiment des Wirts über das identifizierte Dileucinmotiv ohne weitere Faktoren rhodophytischen Ursprungs möglich.

Im Zuge dieser Arbeit wurde auf Basis der identifizierten Proteine, die aus isolierten Vakuolen der Rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* stammen (Yagisawa et al. 2009), das Genom von

P. tricornutum auf homologe Proteine untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass keine Homologe zu den identifizierten vakuolären Proteinen von *C. merolae* vorhanden sind. Aufgrund dieser Beobachtung könnte das Vorhandensein von vakuolären Proteinen rhodophytischen Ursprungs auf eine Modellierung eines wirtsspezifischen lysosomalen Organells hindeuten.

Die Hypothese der Modellierung eines bereits vorhandenen Organells könnte ebenfalls auf vakuoläre Proteine chlorophytischen Ursprungs übertragen werden. Die Präsenz von Proteinen chlorophytischen Ursprungs in der Heterokontophyte *P. tricornutum* widerspricht allerdings der Chromalveolatenhypothese, sofern von einer kryptischen Endosymbiose mit einer Chlorophyte vor der Akquirierung einer Rhodophyte ausgegangen wird (Dorrell und Smith 2011; Dorrell et al. 2017). Es konnte in vorherigen Publikationen bereits gezeigt werden, dass in Diatomeen einige Gene chlorophytischen Ursprungs sind, wie beispielsweise VSRs, die jedoch nicht in Glaucophyten und Rhodophyten detektiert werden konnten (Becker und Hoef-Emden 2009). Dennoch muss berücksichtigt werden, dass das Vorhandensein von „grünen Genen“ auch polygenetische Artefakte aufgrund limitierter Genomdaten von Rhodophyten darstellen könnten oder auch auf lateralen Gentransfer zurückzuführen sind (Moustafa et al. 2009; Woehle et al. 2011; Burki et al. 2012a). Möglicherweise könnte auch die Vermutung angestellt werden, dass das lysosomale Kompartiment des Wirts durch eine Vakuole des Symbionten aus einer kryptischen Endosymbiose mit einer Chlorophyte ersetzt wurde (Dorrell und Smith 2011; Dorrell et al. 2017). Ausgehend von der Möglichkeit, dass das lysosomale Kompartiment des Wirts kein stabiles Organell darstellte, die Vakuole des Symbionten jedoch als solches schon im EMS etabliert wurde, könnte das Ersetzen des wirtsspezifischen Kompartiments einen evolutionären Vorteil in Bezug auf Detoxifizierung der Zelle verschaffen. Eine Proteomanalyse der zentralen Vakuole von *P. tricornutum* mit anschließenden phylogenetischen Analysen könnten weitere Möglichkeiten bieten, um die in dieser Arbeit angestellten Vermutungen zu stützen oder zu widerlegen.

4 Zusammenfassung

Der Proteintransport zum Lysosomen bzw. der Vakuole erfolgt über das Endomembransystem (EMS), das sich in seiner einfachsten Form aus endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat, und Endosomen zusammensetzt. Die Membranen des EMS stehen über Vesikel, die durch Abschnüren und der Fusion mit der Zielmembran in Verbindung stehen. Damit ein Protein zu seinem Zielkompartiment gelangt, werden spezifische Targetingsignale benötigt, die entweder N-terminal, C-terminal oder innerhalb der Aminosäuresequenz des zu transportierenden Proteins lokalisiert sind. Diese Targetingsequenzen werden entweder von spezifischen Rezeptoren oder von Adapterprotein-Komplexen erkannt, die im späten sekretorischen Weg den Transport über Clathrin-umhüllte Vesikel vermittelt. Über den Proteintransport in die zentrale Vakuole der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* war bisher nichts bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteinzusammensetzung der zentralen Vakuole über *in silico* und *in vivo*-Ansätze untersucht. Potentielle Vakuolenproteine wurden über bioinformatischen Analysen hinsichtlich N-terminaler Zielsteuerungssequenzen, Transmembrandomänen, konservierten Proteindomänen und potentiellen Targetingsignalen untersucht und anschließend mithilfe von exprimierten eGFP-Fusionenproteinen auf ihre subzelluläre Lokalisation untersucht. Dabei konnten neben den bereits bekannten vakuolären Membranproteinen neun weitere Vakuolenproteine identifiziert werden, die unter anderem auf einen Import oder Export von Sekundärmetaboliten, Kationen und Polysacchariden hindeuten. Diese Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die zentrale Vakuole neben der Speicherung von Chrysolaminarin auch lytische Funktionen hinsichtlich der Proteindegradation und bei der Detoxifizierung von Xenobiotika übernimmt.

Ein weiterer Teil beschäftigte sich mit der Untersuchung des Proteintransports in die zentrale Vakuole sowie der Identifizierung von Targetingsignalen. Durch die Generierung von Aminosäureaustausch-Mutanten und Chimären gelang es mehrere Targetingsignale zu identifizieren und zu verifizieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Tyrosin- oder Dileucinmotive für den vakuolären Proteintransport relevant sind. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Proteintransport zur zentralen Vakuole von *P. tricornutum* ähnlich wie in Pflanzen- oder Säugerzellen ablaufen könnte.

Zusätzlich konnten anhand der in dieser Arbeit identifizierten vakuolären Proteine vorläufige phylogenetische Untersuchungen durchgeführt werden, die erste Vermutungen in Bezug auf den evolutionären Ursprung des Vakuolenproteoms zulassen.

4.1 Abstract

Protein transport to vacuoles or lysosomes takes place via the endomembrane system (EMS). The EMS is composed of the endoplasmic reticulum (ER), the Golgi apparatus and endosomes in its simplest constellation. The compartments of the EMS are connected by vesicles. These vesicles bud off the EMS and allow to transfer cargo proteins among the EMS. To find their final destination proteins need specific targeting signals located at the N-terminus, C-terminus or within the protein sequence. Those targeting signals can be recognized either by receptors or adaptor protein complexes, which mediates the transport of cargo proteins via clathrin coated vesicles in the late secretory pathway. However, Targeting of proteins to the central vacuole of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is poorly investigated. As part of this study the protein composition of the central vacuole was analyzed by using *in silico* and *in vivo* approaches. Putative vacuolar proteins were investigated by bioinformatic analyses regarding to N-terminal targeting sequences, trans-membrane domains, conserved protein domains and putative targeting signals. Subsequently, the candidates were expressed as eGFP fusion proteins for investigating their subcellular localization. Beside the already known vacuolar membrane proteins in *P. tricornutum*, this screen resulted in the identification of nine proteins in total new vacuolar membrane proteins, which might be involved in import or export of secondary metabolites, cations and carbohydrates. Apart from storing chrysolaminarin, the results of this work indicate that the central vacuole is a lytic compartment in respect to protein degradation and detoxification of xenobiotics.

A further part of this study dealt with the investigation of protein targeting to the central vacuole as well as the identification of targeting motifs. By generating mutated versions of the vacuolar membrane located proteins, the results indicate that tyrosine and dileucine motifs are relevant for vacuolar transport. Furthermore, the results suggest that the protein transport to the central vacuole of *P. tricornutum* are comparable to those in plants or mammals.

In addition, preliminary phylogenetic studies based on the vacuolar proteins identified in this work were performed. This preliminary analyses allow initial assumptions regarding the evolutionary origin of the vacuole proteome.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Organismen

Für die Isolation von genomischer DNA, RNA und Proteinextrakt sowie für Lokalisationsstudien wurde *Phaeodactylum tricornutum*, für Klonierungs- und Vermehrungsprozessen von Vektoren wurde *Escherichia coli* verwendet (Tab. 13)

Tabelle 13: Verwendete Organismen mit Genotyp und Herkunft

Organismus	Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>P. tricornutum</i>	CCAP1055/1		AG Kroth, Universität Konstanz
<i>E. coli</i>	TOP10	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ	Invitrogen

5.1.2 Oligonukleotide und Vektoren

Oligonukleotide für PCRs und Sequenzierungen wurden von der Firma Sigma synthetisiert und auf eine Konzentration von 5 pmol/ μ L eingestellt. Die verwendeten Vektoren sind in Tab. 14 aufgeführt. Verwendete Primer befinden sich im Anhang (s. Tab. 32).

Tabelle 14: Verwendete Vektoren mit ihren *Accession numbers*

Vektor	Aufbau	NCBI Accession Number
pJet 1.2	Rep (pMB1), ori, bla (ampR), eco471R, PlacUV5, T7-Prom, MCS	EF694056
pPha_NR	ampR, PNR, MCS, TNR, sh ble (Zeozin), ori	JN 180663
pPha NR DUAL_2xNR	ampR, PNR, MCS1, TNR, PNR, MCS2, TNR, sh ble (Zeozin), ori	JN 180664

5.1.3 DNA-und Proteinmolekulargewichtsstandards

Für die Ermittlung der DNA-Fragmentgröße wurde der 1 kb Ladder von Fermentas, zur Bestimmung des Proteinmolekulargewichts wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Invitrogen verwendet.

5.1.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roche, Roth, Sigma, Dr. Biener GmbH und InvivoGen bezogen und nach Herstellerangaben verwendet und gelagert.

5.1.5 Enzyme

Verwendete Restriktionsendonukleasen (10 U/ μ L) sowie die T4-Ligase (5 U/ μ L) und DNaseI (1 U/ μ L) wurden bei der Firma Invitrogen erworben, der Q5 2x *High Fidelity Master Mix* und die 5' Exonuklease (10 U/ μ L) stammen von NEB. Der Taq-Polymerase Master Mix wurde von der Firma Biotools bereitgestellt.

5.1.6 Lösungen und Medien

Lösungen und Medien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Anhang (s. Kap. 7.9) aufgeführt.

5.1.7 Molekularbiologische Kits

In Tabelle 15 sind die molekularbiologischen Kits aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 15: Verwendete molekularbiologische Kits

Kit	Firma
Hi Yield® PCR Clean-up Gen Extraction Kit	Süd Laborbedarf GmbH
Clone Jet™ PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific
QIAGEN Plasmid Purification Midi Kit	Qiagen N.V.
Site Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs Inc.

5.1.8 Antikörper

Die für die Immunodetektion verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tab. 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Verwendete Antikörper

	Antikörper	Firma
Primärantikörper	α -GFP (goat; 1:3.000)	Biomol
	α -RbcL (rabbit; 1:5.000)	Agrisera
	α -PsbD (rabbit; 1:5000)	Agrisera
Sekundärantikörper	α -Goat (HRP-gekoppelt; 1: 10.000)	Sigma
	α -Rabbit (HRP-gekoppelt; 1:10.000)	Sigma

5.1.9 Computer- und Internetanwendungen

Die Nukleotidsequenzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden mit dem Computerprogramm Sequencher (Version 5.3) der Firma GeneCodes bearbeitet und analysiert. Phylogenetische Analysen wurden mit dem Programm MEGA7 durchgeführt. Fluoreszenzaufnahmen wurden mithilfe der Bildbearbeitungsprogramms ImageJ bearbeitet. Alignments wurden mit den Computerprogrammen ClustalX2 und GeneDoC generiert.

Internetanwendungen

BlastN, BlastP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

PhatrDBv2.0 <http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/>

SignalP 3.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>

Signal P 4.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

TMHMM <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

TOPCONS <http://topcons.cbr.su.se/>

ELM <http://elm.eu.org/search/>

NEBuilder <http://nebuilder.neb.com/>

TM Calculator <http://tmcaculator.neb.com/#!/>

5.1.10 Geräte

Der verwendeten Geräte sind in Tab. 17 aufgelistet.

Tabelle 17: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Centrifuge 5810R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf
Centrifuge 5417R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf
Centrifuge 5415D (Tischzentrifuge)	Eppendorf
Micro 22 R (Kühlzentrifuge)	Hettich
Ultrazentrifuge L7-55	Beckmann
Eppendorf Research 1-5 mL	Eppendorf
Eppendorf Research 100-1000 µL	Eppendorf
Eppendorf Research 20-200 µL	Eppendorf
Eppendorf Research 2-20 µL	Eppendorf
Eppendorf Research 0,1-2 µL	Eppendorf
Mastercycler-Personal	Eppendorf
Mastercycler-Gradient	Eppendorf
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech
Gel-Kammern verschiedener Größen	Werkstatt PUM
Pharmacia LKB GPS 200/400 Power Supply	Pharmacia Biotech
Transilluminator	PeqLab
Nitrocellulosemembran	Macherey-Nagel
Whatman-Filterpapier 3mm	Schleicher&Schuell
FB30/ 0,2 CA – S Sterilfilter	Schleicher&Schuell
Fuji Medical X-Ray Film 30x40 cm	Fuji
Röntgenfilmentwickler	Kodak
Röntgenfilmfixierer	Kodak
Elektrophoresis Power Supply EPS 301/601	Amersham Biosciences
TE 77 Semy-Dry Transfer Unit	Amersham Biosciences
Bio-Rad Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System	Biorad Laboratories
Certomat R Schüttler	Braun Biotech

Exsikkator	Nalgene
Frenchpress SLM-AMINCO 4-3399	SLM-AMINCO
Klimaschrank MLR 350	Sanyo
Klimakammer	Weiss
KLSM Leica TCS SP2	Leica Microsystems
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	PeqLab
Spectralphotometer Ultrospec 2000	GE-Healthcare
Thermocycler 60	Bio-Med
Thermocycler comfort	Eppendorf
TRM-V Taumelschüttler	MAGV
Gel-Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph
Vortexer REAX 1DR	Heidolph

5.2 Methoden

5.2.1 Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli*

Rekombinante Plasmid-DNA wurde mithilfe von *Escherichia coli* vermehrt. Hierfür wurde ein Aliquot einer Glycerol-Kultur oder eine Bakteriensuspension nach einer Transformation unter sterilen Bedingungen auf eine LB-Agarplatte mit Antibiotikum (Ampicillin, Endkonzentration 50 µg/mL) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde mithilfe eines Zahnstochers in 3 mL LB-Flüssigmedium mit Antibiotikum (Ampicillin, 50 µg/mL) überführt und ebenfalls über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur konnten folglich 1,5 mL für eine Plasmid- Isolation (s. Kap. 5.2.10) eingesetzt werden.

5.2.1.1 Glycerol-Kulturen zur Lagerung bakterieller Kulturen

Bakterien-Kulturen können längerfristig als Glycerol-Kulturen gelagert werden. Zur Herstellung einer Glycerol-Kultur, wurden 500 µL einer Bakterienkultur mit 500 µL sterilem, 100%-igen Glycerol versetzt und gründlich vermischt. Das Bakterien-Glycerol-Gemisch konnte anschließend bei -80°C gelagert werden.

5.2.2 Kultivierung und Lagerung von *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum wurde in f/2-Medium bei Dauerlicht (8.000-11.000 Lux) und 21°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden im Erlenmeyerkolben schüttelnd bei 150 rpm kultiviert. Zur Kultivierung auf Platten wurden dem f/2-Medium 1,5 % Agar-Agar zugesetzt. Für die Stammhaltung von positiv transformierten Klonen wurde den f/2-Platten zusätzlich Zeocin (Endkonzentration 75 µg/mL) hinzugefügt. Eine Lagerung der Stammhaltung erfolgte bei Tag/Nacht Rhythmus im Klimaschrank.

5.2.2.1 Glycerol-Kulturen zur Lagerung von *Phaeodactylum tricornutum*

Zur längerfristigen Lagerung von *P. tricornutum* wurden Glycerol-Kulturen erstellt. Eine 50 mL f/2-Flüssigkultur positiv transformierter Klone wurde in der stationären Phase geerntet (1.500 g, 5 min,

RT) und anschließend in f/2-Flüssigmedium mit Antibiotika (Zeocin 75 µg/mL, Kanamycin 25 µg/mL) und 5 % Glycerol in einem *Cool Cell LX freezing container* über Nacht bei -80°C langsam herunter gekühlt. Die Glycerol-Kulturen konnten im Anschluss bei -80 °C gelagert werden.

5.2.3 Isolation von genomischer DNA aus *Phaeodactylum tricornutum* (modifiziert nach Doyle 1990)

Die Isolation von genomischer DNA (gDNA) aus *Phaeodactylum tricornutum* erfolgte mit der CTAB-Methode (Doyle 1990). Für die Isolation wurde eine 150 mL *P. tricornutum*-Kultur in der stationären Phase geerntet (2.000 g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in 800 µL 2x CTAB (Puffer B), resuspendiert und für 1 h bei 70°C inkubiert und im Anschluss für 5 min bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol PCI versetzt und nochmals zentrifugiert (10 min, 15.000 g, RT). Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Vol 2 M Natriumacetat und 2/3 Vol Isopropanol vermischt. Zur Fällung der gDNA wurde der Ansatz für 20 min bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70-%igen Ethanol gewaschen (10 min, 20.000 g, 4°C). Anschließend wurde das pellet getrocknet und in 50 µL ddH₂O resuspendiert. Die isolierte gDNA kann über längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

5.2.4 Isolation von RNA aus *Phaeodactylum tricornutum*

Für eine cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase wurde gesamt-RNA aus *Phaeodactylum tricornutum* isoliert. 150 mL einer in der stationären Phase befindenden *P. tricornutum*-Kultur wurden bei 2.000 g für 10 min und Raumtemperatur (RT) pelletiert. Das Pellet wurde in 3 mL NAES aufgenommen und anschließend zu je 500 µL aliquotiert. Zu den Aliquots wurden jeweils 500 µL Aqua-Phenol und eine Spatelspitze Glasbeads (acid-washed, 450 µm -600 µm Durchmesser) dazu gegeben und für 30 s auf dem Vortex-Mixer gemischt. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (20.000 g, 20 min, RT) und die wässrige Phase in ein neues 1,5 µL Reaktionsgefäß überführt. Zu der wässrigen Phase wurde 1 Vol PCI pipettiert, das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und erneut zentrifugiert (20.000 g, 10 min, 4°C). Die wässrige Phase wurde nochmals in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol steril-filtrierten Chloroform vermischt und nochmals zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Im Anschluss wurde die wässrige Phase mit 2/3 steril filtrierten Isopropanol versetzt und die RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Das Isopropanol-Gemisch wurde für 20 min bei 20.000 und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%-igen, steril filtrierten Ethanol gewaschen (20.000 g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Im Anschluss wurde das pellet in 10 µL- 30 µL 1 %-igen DEPC oder RNAsen-freien ddH₂O aufgenommen und für eine cDNA-Synthese weiter verwendet.

5.2.4.1 DNase I-Behandlung und cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Die isolierte gesamt-RNA wurde einer DNase I-Behandlung unterzogen, um mögliche genomische DNA aus den RNA-Proben zu entfernen. Für die DNase I-Behandlung wurde 1 µg der isolierten gesamt-RNA eingesetzt. In Tab. 19 ist der Reaktionsansatz für die DNase I Behandlung gezeigt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 µL 50 mM EDTA für 10 min bei 65°C gestoppt. Die mit DNase I behandelte gRNA wurde im Anschluss für eine cDNA-Synthese weiter verwendet.

Tabelle 18: Reaktionsansatz für DNase I-Behandlung

Gesamt-RNA	1 µg
10 x Reaktionspuffer mit MgCl ₂	1 µL
DNase I (RNase-frei) 1 U/µL	1 µL
RNase-freies ddH ₂ O	x µL
Gesamtvolumen	10 µL

Die cDNA-Synthese wurde mit dem *RevertAid* Reverse Transkriptase-Kit der Firma Invitrogen durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden 100 ng gesamt-RNA eingesetzt, die zuvor mit DNase I behandelt wurde. Der Reaktionsansatz sowie das cDNA-Syntheseprogramm kann aus den Tabellen 19 und 20 entnommen werden.

Tabelle 19: Reaktionsansatz für cDNA-Synthese

Gesamt-RNA	0,1 ng – 5 µg
Random Hexamer Primer (100 µM)	1 µL (0,2 µg)
5 x Reaktionspuffer	4 µL
Thermo Fisher RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µL)	0,5 µL
dNTP's (10 mM)	2 µL
RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/µL)	1 µL
ddH ₂ O	x µL
Gesamtvolumen	20 µL

Tabelle 20: PCR-Programm für cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit	Wiederholungen
25°C	10 min	1x
42°C	60 min	1x
70°C	10 min	1x
4°C	∞	

Die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde anschließend bei -80°C gelagert. Für eine PCR wurde 2 µL der Reaktion eingesetzt.

5.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Spezifische DNA-Fragmente können gezielt durch eine Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden. Dies geschieht mit einer hitzebeständigen Polymerase, die zur Anlagerung an die DNA 20–25 bp lange Oligonukleotide, so genannte Primer, benötigt. Die Primer lagern sich nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA an den zu amplifizierenden Abschnitt der Template-DNA und flankieren diesen. Mithilfe der Primer können nicht nur DNA-Fragmente Amplifiziert werden, sondern auch Schnittstellen von Restriktionsenzymen oder auch Sequenzen für Tags angefügt werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet. Für das Anheften von flankierenden Restriktionsschnittstellen, eines 10x *Histags* oder für eine PCR, die für das Gibson Assembly verwendet wurde, wurde der *Q5 2x High Fidelity Master Mix* von NEB verwendet. Diese Polymerase hat den Vorteil einer Proof Reading Aktivität und einer hohen Syntheserate. Die Taq-Polymerase (Biotools) hingegen besitzt keine Proof Reading Aktivität, jedoch eine hohe Prozessivität und wurde für Kontroll- oder Kolonie-PCRs verwendet.

Die verwendeten PCR-Ansätze sowie die dazugehörigen PCR-Programme können aus den Tabellen 21-24 entnommen werden.

Tabelle 21: PCR-Ansatz für die Taq-Polymerase

2x PCR super Master Mix	7,5 µL
MgCl (50 mM)	1 µL
Forward Primer (10 mM)	1 µL
Reverse Primer (10 mM)	1 µL
Template	10 – 20 ng
ddH ₂ O	x µL
Gesamtvolumen	15 µL

Für den Nachweis von eingebrachten DNA-Sequenzen aus *P. tricornutum* wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde mithilfe einer Impföse Zellmaterial in 50 µL ddH₂O überführt, für 10 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf Eis gekühlt. Um Zelldebris zu entfernen wurde der Ansatz für 1 min bei 20.000 g zentrifugiert und von dem Überstand 2 µL für eine Kontroll-PCR eingesetzt.

Tabelle 22: PCR-Programm für die Taq-Polymerase

Phase	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	1 min	} 30-35x
Annealing	50 – 65°C	30 s	
Elongation	72°C	1 kb/min	
Finale Elongation	72°C	5 min	1x
Kühlung	4°C	∞	

Tabelle 23: PCR-Ansatz für die Q5-Polymerase

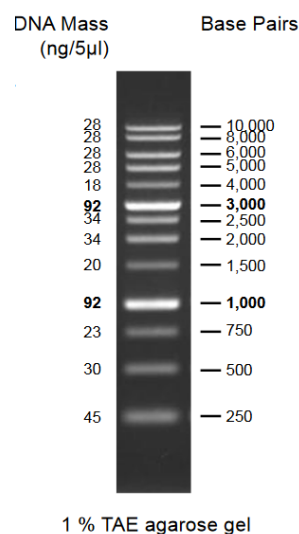
2x Q5 <i>high fidelity</i> Master Mix	7,5 µL
Forward Primer (10 mM)	1,5 µL
Reverse Primer (10 mM)	1,5 µL
Template	1 pg – 1 ng
ddH ₂ O	x µL
Gesamtvolumen	15 µL

Tabelle 24: PCR-Programm für die Q5-Polymerase

Phase	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98°C	2 min	1x
Denaturierung	98°C	15 s	30-35x
Annealing	50 – 72°C	30 s	
Elongation	72°C	1 kb/20-30 s	
Finale Elongation	72°C	2 min	1x
Kühlung	4°C	∞	

5.2.6 Agarosegelelektrophorese und DNA-Elution

DNA-Fragmente können mithilfe eines elektrischen Feldes durch eine Agarosestruktur ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die durch ihre Phosphatgruppe negativ geladene DNA wandert abhängig ihrer Größe und Konformation gegen die elektrische Feldrichtung zur Anode hin. Zu dem Agarosegel wurde, bevor dieses auspolymerisiert ist, eine interkalierende Substanz hinzugefügt, die unter UV-Licht fluoresziert und die DNA für die Auswertung visualisierbar macht. In dieser Arbeit wurde als interkalierende Substanz Roti®-Gelstain von Roth verwendet. Von dieser wurde, ausgehend von der Stammlösung 0,003 % (v/v) zu 1 %-igen (w/v) Agarosegelen (Agarose in 1 x TBE-Puffer) hinzugeben. Nach Auspolymerisierung der Gele wurden die DNA-Proben mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Enthielten die verwendeten Puffer bereits Ladepuffer (2x PCR Super Master Mix) war eine zusätzliche Zugabe von 6x Ladepuffer nicht mehr notwendig. Die angelegte Spannung des Gels betrug 140 – 160 V. Neben der DNA-Proben wurde zusätzlich ein Größenmarker auf das Gel aufgetragen, um die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen. Im Zuge dieser Arbeit wurde der 1 kb Ladder der Firma Fermentas verwendet. Abb. 41 zeigt den verwendeten Marker.

**Abbildung 41: 1 kb Ladder von GeneDirex**

5.2.7 DNA Elution aus Agarosegelen

Die DNA einer gelelektrophoretischen Auftrennung kann aus dem Gel eluiert werden, um mit dieser beispielsweise nach Restriktionsverdau oder PCR weiter arbeiten zu können. Hierfür wurde das Agarosegel mit UV-Licht bestrahlt, um die DNA-Bande sichtbar zu machen, und die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymoresearch) oder mit dem High Yield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (SLG), wurde die DNA aus dem Agarosegel eluiert. Die Kits verwenden chaotrophe Salze, die die Agarosematrix auflösen und somit die DNA freisetzen. Die DNA wurde anschließend über eine DNA-Säulen Matrix gebunden und nach Herstellerangaben aufgereinigt.

5.2.8 Klonierung durch Restriktion und Ligation

Eine wichtige Methode in der Molekulargenetik ist die Klonierung. Dabei wird eine bestimmte DNA-Sequenz in einen beliebigen Vektor integriert. Häufig wird hierbei ein DNA-Fragment kloniert, welches vorher mittels Restriktionendonukleasen ausgeschnitten, aufgereinigt oder über eine PCR amplifiziert wird. Mittels Ligase wird das amplifizierte Insert in ein linearisiertes Vektorrückgrat ligiert.

Restriktion

Für eine Restriktion werden Enzyme benötigt, die die DNA zerschneiden können. Sogenannte Endonukleasen identifizieren spezifische DNA-Sequenzen und schneiden an der identifizierten Stelle den DNA-Doppelstrang. Je nach Enzym entstehen dabei glatte DNA-Enden (*blunt ends*) oder freistehende Enden (*sticky ends*). In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme von Fermentas verwendet. In der folgenden Tabelle ist ein Restriktionsansatz gezeigt der hauptsächlich zur Kontrolle von Klonierungen angesetzt wurde.

Tabelle 25: Restriktionsansatz

10x SDB oder 10x Tango Puffer	1 µL
Restriktionsenzym(e) (10 U/µL)	je 0,3 µL
DNA	0,5 – 3 µg
ddH ₂ O	x µL
Gesamtvolumen	10 µL

Ligation

Nach einer erfolgreichen Restriktion erfolgt die Ligation, in der das restingierte DNA-Fragment (Insert) in ein linearisiertes Vektorrückgrat ligiert wird. Für eine Ligation wird eine Ligase benötigt,

die die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxyl- und dem 5'-Phosphatende katalysiert. Der Ligationsansatz (Tab. 26) wurde für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in chemisch Kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (s. Kap. 5.2.9)

Tabelle 26: Ligationsansatz für die T4-Ligase

Eluat (Insert und linearisierter Vektor)*	8 µL
10x T4-Ligasepuffer	1 µL
T4-Ligase (10 U/µL)	1 µL
Gesamtvolumen	10 µL

*Insert und linearisierter Vektor wurden nach dem Restriktionsverdau gemeinsam über eine Säule eluiert (s. DNA-Elution aus Agarosegelen)

Gibson Assembly (modifiziert nach Gibson 2009)

Alternativ zur Restriktion und Ligation kann eine Klonierung über das Gibson Assembly erfolgen. Das Gibson Assembly basiert auf eine einzige isothermale Reaktion, in der mehrere, überlappende DNA-Fragmente durch gleichzeitige Reaktionsaktivität einer 5'-Exonuklease, einer DNA-Polymerase und der Taq-Ligase assembliert werden (Abb. 42). Der Vorteil dieser Klonierungsmethode besteht darin, dass DNA-Fragmente ohne Rücksicht auf Restriktionsschnittstellen „nahtlos“ fusioniert werden und bestimmte DNA-Abschnitte beispielsweise durch Punktmutationen modifiziert werden können.

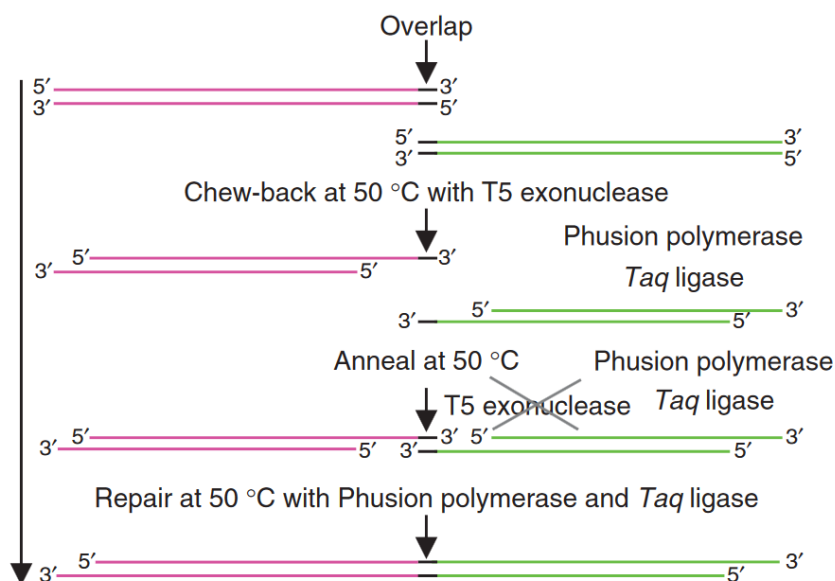


Abbildung 42: Schematische Darstellung des Gibson Assemblys. Zwei zu fusionierende DNA Fragmente (gezeigt in grün und magenta) besitzen jeweils einen Überhang (in schwarz gekennzeichnet), welche komplementär zu den Fusionspartnern sind. In einer isothermalen simultanen Reaktion. Die T5

Exonuklease, die während der Reaktion bei 50°C aufgrund ihrer Instabilität inaktiviert wird, spaltet Nukleotide vom 5'-Ende des doppelsträngigen DNA-Moleküls ab, die überlappenden Enden werden annealt. Während die Phusion DNA Polymerase die entstandenen Lücken auffüllt, ligiert die Taq DNA Ligase die Fragmente (Abbildung aus Gibson 2009).

Vor der Gibson-Reaktion werden die zu klonierenden DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Hierbei werden Primer verwendet, die das Zielgen mit einem Überhang eines weiteren Zielgens flankieren (Abb. 36). Die amplifizierten Fragmente wurden über eine Säule direkt oder nach einer Elution aus dem Gel eluiert (s. DNA-Elution aus Agarosegele). Der Vektor, der für die Gibson-Reaktion verwendet werden soll, wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen restringiert, auf ein Agarosegel aufgetragen und ebenfalls über Säulen eluiert (s. DNA-Elution aus Agarosegelen). Der Gibson-Reaktionsansatz kann aus der Tab. 27 entnommen werden. Der Ansatz wurde 1 h bei 50°C inkubiert.

Tabelle 27: Gibson Reaktionsansatz

	2-3 Fragment Assembly	4-6 Fragment Assembly
Gesamtmenge der Fragmente	0,02- 0,5 pmol*	0,2-1 pmol
Gibson Reaktionsmix	15 µL	15 µL
ddH ₂ O	x µL	x µL
Gesamtvolumen	20 µL	20 µL

*Für die Berechnung der Konzentration der Fragmente wurde die Länge und das Gewicht der Fragmente berücksichtigt und mit folgender Formel berechnet: $\text{pmol} = (\text{Gewicht [ng]} \times 1000) / (\text{Länge [bp]} \times 650 \text{ daltons})$. Um eine hohe Klonierungseffizienz zu erreichen, wurden 100 ng des Vektors sowie die dreifache Menge an Inserts verwendet.

5.2.9 Transformation von Bakterien

5.2.9.1 Herstellung von chemisch-kompetenter Zellen

Für die Herstellung von chemisch-kompetenter Zellen wurden zwei 1,5 L Hauptkulturen mit einer 200 mL Vorkultur angeimpft, so dass die Hauptkultur eine OD₆₀₀ von 0,1 aufwies. Anschließend wurden MgSO₄ und MgCl₂ (finale Konzentration jeweils 10 mM) dazu gegeben. Die Hauptkulturen wurden bei 37°C und 200 rpm so lange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht worden war und anschließend auf Eis für 30 min gekühlt. Die Bakteriensuspension wurde auf sechs 50 mL Falcons verteilt und für 10 min bei 3.000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Der Zentrifugationsschritt wurde so lange wiederholt, bis die gesamte Bakteriensuspension vollständig pelletiert wurde. Die Pellets wurden in 33 mL vorgekühlten TBF1-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (3.000 g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 5 mL TBF2 resuspendiert. Die Suspensionen wurden in 15 mL Falcons überführt und nochmals 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die chemisch-

kompetenten Zellen in 100 µL Aliquots aufgeteilt, mithilfe von flüssigen Stickstoff unverzüglich schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.9.2 Hitzeschock Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Ein 100 µL-Aliquot chemisch-Kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und 50 µL auf den Ligations- bzw. Gibsonreaktionsansatz gegeben. Nach kurzen auf und ab pipettieren wurde das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde bei 42°C für 45 s inkubiert und im Anschluss für 1 min auf Eis gestellt. Die transformierten Zellen wurden zur Selektion auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.10 Plasmid-Isolation und Konzentrationsbestimmung (Mini-Präparation)

Die Mini-Präparation ist für eine Isolation kleiner DNA-Mengen aus einer kleinen Kultur geeignet. Die Isolation von rekombinanten Plasmiden aus *E. coli* erfolgte über alkalische Lyse. Dafür wurde 1,5 mL einer 3 mL Übernachtskultur in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 20.000 g für 30 s und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µL P1-Puffer resuspendiert und anschließend mit 200 µL P2-Puffer versetzt. Nach mehrmaligen Invertieren wurde das Gemisch bei RT für maximal 2 min inkubiert. Im Anschluss folgte die Zugabe von 200 µL P3-Puffer und 40 µL Chloroform. Nach kräftigem Schütteln wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert und nochmals kräftig geschüttelt. Anschließend wurde 5 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mittels 400 µL Isopropanol gefällt (20.000 g, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde nochmals verworfen und das DNA-Pellet mit 300 µL 70%-igem Ethanol für 3 min bei 20.000 g und 4°C gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet getrocknet und konnte im Anschluss in 40 µL ddH₂O aufgenommen werden.

5.2.11 Midipräparation aus *Escherichia coli*

Für Plasmidpräparationen hochreiner DNA im größeren Maßstab, zum Beispiel für die Transfektion von *P. tricornutum* mittels Partikel Bombardment, wurde das *Plasmid Purification Midi Kit* von Qiagen entsprechend den Vorschriften des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils 50 mL einer bei 37°C gewachsenen Übernachtskultur eingesetzt. Das Prinzip beruht hier ebenfalls auf der alkalischen Lyse und der Bindung an eine gravimetrische Säule.

5.2.12 Konzentrationsbestimmung

Zur Messung der DNA-Konzentration dient das Gerät „Thermo Scientific NanoDrop™100“ der Firma PEQLAB. Hierbei wurde 1-2 µL von einer zu messenden DNA-Probe die Konzentration und die Reinheit photometrisch bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Reinheit der DNA lässt sich aus dem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermitteln. Ein Quotient von 1,8-2,0 signalisiert eine reine DNA. Abweichungen weisen auf eine Verunreinigung hin.

5.2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde von der Firma Macrogen (<http://www.macrogen.com>) durchgeführt. Die Proben, die sequenziert werden sollten, wurden auf eine Konzentration von 500 ng in 5 µL eingestellt und mit 5 µL des Sequenzierprimers (5 pmol/µL) versetzt.

5.2.14 Biolistische Transfektion der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* (modifiziert nach Apt et al. 1996)

Eine geeignete Methode für Lokalisierungsstudien ist der Beschuss von Pflanzenmaterial mittels Partikelkanone. Hierfür muss die DNA an Trägermaterial gebunden werden, das anschließend unter Vakuum direkt in lebende Zellen geschossen wird. Der Beschuss wurde an einer Heliumkanone durchgeführt.

Vorbereitung der Microcarrier

Für die Vorbereitung der Microcarrier wurden 60 mg M10 Wolframpartikel (\emptyset 0,7 µm) in 1mL absoluten Ethanol (HPLC-Qualität) aufgenommen und für 3 min -5 min mittels Vortexer gut gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min bei 14.000 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL sterilem ddH₂O resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation (1 min bei 14.000 g). Der Überstand wurde nochmals verworfen, mit 1 mL ddH₂O gewaschen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Wolframpartikel in 1 mL ddH₂O resuspendiert und im Anschluss jeweils 50 µL in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20 °C gelagert und konnte für das biolistische Transfektion verwendet werden.

Vorbereitung der *Phaeodactylum tricornutum*-Kultur

Für die Transdefektion wurde eine 7 d alte *P. tricornutum*-Kultur verwendet. Von dieser wurde die Zellzahl mittels Thomazählkammer bestimmt (Gesamtzellzahl = \emptyset Zellen pro Kleinquadrat \times 4 \times 10⁶ \times Volumen der Flüssigkultur in ml). Die Zellkultur wurde im Anschluss bei 1.500 g (RT) 5 min abzentrifugiert und mit f/2-Flüssigmedium auf eine Zelldichte von 10⁸-Zellen/ 100 µL eingestellt. Ausgehend von dieser Zellkultur wurden jeweils 100 µL auf Agarplatten mit f/2-Festmedium (ohne Selektionsmarker) mithilfe einer Impföse in der Mitte der Agarplatte kreisrund (\emptyset ca. 5 cm) ausplattiert. Nach Antrocknen der Kultur konnten die vorbereiteten Kulturen für die biolistische Transfektion verwendet werden. Alternativ kann die *P. tricornutum*-Kultur 24 h vor biolistischer Transfektion vorbereitet werden.

Coaten der DNA

Für das Coaten der DNA an die Wolframpartikel wurde in ein M10-Aliquot 5 µg DNA (max. 8 µL Endvolumen), 50 µL CaCl₂ (2,5 M) und 20 µL Spermidin (0,1 M) hinzu gegeben und mithilfe des Vortexers 1 min kräftig gemischt. Das Gemisch wurde zur Sedimentierung für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Partikel mit 200 µL absoluten Ethanol (HPLC-Qualität) resuspendiert (1 min vortexen). Nach einer weiteren Sedimentation von 10 min wurde der Ethanol abgenommen, die Partikel in 50 µL absoluten Ethanol aufgenommen und direkt für die Transfektion verwendet.

Partikelbombardment

Die Bestandteile der Partikelgun (Macrocarrier, Rupture Disk, Metallring) wurden mit absoluten Ethanol gereinigt und das Metallnetz abgeflammt. 15 µL der vorbereiteten Wolframpartikel wurden auf einem sterilisierten Microcarrier (flying disc) aufgetragen und unter sterilen Bedingungen getrocknet. Pro Konstrukt werden drei Microcarrier vorbereitet. Für den Zusammenbau der Apparatur wurde die Rapture Disk (1350 psi bzw. 1550 psi) im oberen Teil eingesetzt und festgeschraubt. Die Microcarrier-Vorrichtung, bestehend aus Halterung, beladenen Microcarrier, und Stopping screen wurde zusammengbaut und in die Partikelgun eingesetzt. Die vorbereiteten f/2-Agarplatten wurden auf Position 2 positioniert. Nach Anlegen eines Vakuums (- 25 psi) wurde Helium in den Accelerator geleitet, bis die Berstscheibe bei definiertem Druck platzt. Der Druck, welcher dabei frei gegeben wird, wirkt auf den Microcarrier. Diese wird dabei auf das Netz geschlagen. Die beladenen Goldpartikel auf dem Microcarrier werden durch den Druck beschleunigt und treffen auf die *P. tricornutum*-Zellen.

Die beschossenen f/2-Agarplatten wurden für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert (s. Kap. 5.5.2). Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 mL f/2-Medium von den Agarplatten abgeschwemmt und auf jeweils zwei f/2-Agarplatten (75 µg/mL Zeocin) ausplattiert und ebenfalls unter Standardbedingungen kultiviert. Nach ca. zwei Wochen wurden gewachsene Kolonien für die konfokale laser scanning Mikroskopie vorbereitet bzw. zur Stammhaltung auf frische f/2-Agarplatten transferiert.

5.2.15 Gewinnung von Gesamtproteinextrakt

Zur Gewinnung des Gesamtproteinextrakts aus *P. tricornutum* wurde eine 50 mL *P. tricornutum*-Kultur in der exponentielle Phase geerntet (1.500 g, 5 min, RT) und in 200 µL Lysepuffer aufgenommen. Das Gemisch wurde mit ddH₂O auf 1 mL aufgefüllt und für 10 min unter mehrmaligen Mischen auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde eine TCA-Fällung zur Präzipitation der Proteine durchgeführt (s. Kap. 5.2.18)

5.2.16 Ankonzentrieren des Überstands

Um sterilfiltrierte Überstände auf das 150 fache aufzukonzentrieren und damit den gesamten Überstand der Zellen auf eine Sekretion testen zu können wurde die Amicon®Ultra 15 Zentrifugeneinheit (max. Volumen 15 mL, 10 KD; Merck Chemicals) verwendet. Dazu wurde der sterilfiltrierte Überstand einer 50 mL *P. tricornutum*-Kultur solange bei 2.500 g und RT zentrifugiert, bis dieser auf circa 1 mL ankonzentriert war. Der ankonzentrierte Überstand wurde anschließend in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit TCA (s. Kap. 5.2.18) behandelt.

5.2.17 Zellfraktionierung und Carbonatextraktion

Die Überprüfung von Proteinen hinsichtlich ihrer Membranintegrität erfolgte über eine Zellfraktionierung mit anschließender Carbonatextraktion. Hierfür wurde eine dicht angewachsene 50 mL *P. tricornutum*-Kultur die Expression des Fusionskonstrukts je nach Konstrukt 6 – 24 h induziert und bei 1.500 g für 5 min bei RT geerntet und im Anschluss in 2,8 mL vorgekühlten Solubilisierungspuffer A resuspendiert und mit PMSF (1 mM) und dem Protease Inhibitor Cocktail (PIC, Endkonzentration 1 mM) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mit der French Press (Amico) bei 1.000 psi (ein Durchgang). Die Zellsuspension wurde im Anschluss bei 3.500 g für 10 min und 4 °C zentrifugiert, um Intakte Zellen und Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde zur Carbonatextraktion in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und in der Ultrazentrifuge bei 120.000 g bzw. 56.000 g und 4°C für 1 h zentrifugiert, um die lösliche Fraktion (Überstand) von der Membranfraktion (Pellet) zu separieren. Jeweils 1 mL des Überstandes wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, der Rest des Überstands wurde verworfen. Das Pellet wurde in 2,8 mL Carbonatpuffer mit PMSF resuspendiert und für 30 -45 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Zentrifugation wiederholt (120.000 g bzw. 56.000 g, 1 h 4 °C), um Membran-assoziierte Proteine (Überstand) von der Membranfraktion (Pellet) zu trennen. Jeweils 1 mL des Überstandes wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäße transferiert, das Pellet wiederum in 2,8 mL Solubilisierungspuffer A aufgenommen und ebenfalls in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt (2 x 1 mL). Jeweils ein Aliquot der Fraktionen wurde für eine TCA-Behandlung (s. Kap. XX) eingesetzt. Für eine SDS-Page wurden gleiche Volumina (ausgehend von 5 µg der integralen Fraktion), eingesetzt.

5.2.18 Präzipitation von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA)

Zur Präzipitation wurden die Proteinproben aus der Carbonatextraktion oder der Gesamtproteinextrakt mit TCA versetzt (Endkonzentration 10 % (v/v)) und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 20 min zentrifugiert (20.000 g, 4°C) und der Überstand verworfen. Der Überstand wurde mit 1 mL 80 %-igem eiskalten Aceton gewaschen und das Pellet mithilfe eines Mikropistills homogenisiert. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Acetonwaschschritte wurden so oft wiederholt, bis der Überstand klar

war. Die Pellets wurden im Exsikkator getrocknet, im Anschluss je nach Größe des Pellets in 20 µL – 150 µL Harnstoffpuffer aufgenommen und für 20 min – 30 min schüttelnd bei 60 °C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (5 min, 10.000 g, RT) und der Überstand für weitere Analysen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anschließend mittels Amidoschwarz (s. Kap. 5.2.19)

5.2.19 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Amidoschwarz (modifiziert nach Schaffner und Weissmann 1973)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über Amidoschwarz 10B. Hierfür wurde 5 µL der Proteinlösung mit 95 µL ddH₂O versetzt und mit 400 µL Amidoschwarz-Färbelösung gemischt. Anschließend wurde die Lösung für 15 min bei 20.000 g (4 °C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µL Amidoschwarz-Waschlösung resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt (15 min, 20.000 g, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Exsikkator getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 1 mL 200 mM NaOH aufgenommen. Die Absorption wurde bei einer OD von 615 nm bestimmt. Anhand einer BSA-Eichgerade wurde die Proteinkonzentration berechnet.

5.2.20 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (1970)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Molekülen. Das SDS (NatriumLaurylsulfat) dient als Detergenz, welches allen Proteinen in einer Probe eine negative Ladung verleiht. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle im Gel ist daher allein abhängig von ihrer Größe. Die Porengröße dieser Gele ist durch unterschiedliche Polyacrylamid-Konzentrationen variabel. Kleinere Proteine durchlaufen das Gel in kürzerer Zeit als Größere. Der Einsatz eines großporigen Sammelgels mit niedrigen pH-Wert bewirkt eine Konzentrierung der Proteine. Im nachfolgenden Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht.

Die Acrylamidkonzentration der Trenngele wurde je nach der molekularen Masse der zu detektierenden Proteine variiert und betrug zwischen 8,5-12,5 % (Tab. 29). Zur Herstellung der Gele wurde eine Mischung aus Acrylamid:N,N' Methylenbisacrylamid im Verhältnis 30:8 eingesetzt (Rothiporese Gel 30, Roth). Der Gellauf erfolgte bei 150 V und 30 mA, als Massenstandard wurden 6- 8 µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) aufgetragen.

Tabelle 28: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

	Trenngel 8,5 %	Trenngel 12,5 %	Sammelgel
30 % (v/v) Arcylamid	2,8 mL	4,1 mL	0,9 mL
ddH₂O	4,5 mL	3,2 mL	2,9 mL
4 x Trenngelpuffer	2,5 mL	2,5 mL	/
4 x Sammelgelpuffer	/	/	1,2 mL
TEMED	20 µL	20 µL	15 µL
10 % (w/v) APS	150 µL	150 µL	80 µL

5.2.21 Färbung von SDS-Gelen mittels Instand Blue

Um Proteine in SDS-Gelen nachzuweisen wurde eine Coomassie Färbung durchgeführt. Das SDS-Gel wurde für eine Stunde in der Instand Blue-Färbelösung, der Firma expedeon, schüttelnd inkubiert. Nachdem Proteinbanden sichtbar wurden, wurde die Instand Blue-Färbelösung entfernt und das SDS-Gel schüttelnd mehrmals mit ddH₂O gewaschen.

5.2.22 Proteintransfer auf eine Trägermembran (Western Blot) (Towbin et al. 1979)

Beim Western Blot wird die negative Ladung der über SDS-Page aufgetrennten Proteine genutzt, um sie auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren. Für den Transfer wurden das SDS-Gel, die Nitrozellulosemembran und sechs Whatman-Papiere in WB-Transferpuffer äquilibriert. Als Blotting-Apparatur wurde das TE 77 Semi-dry Transfer-System (GE-Healthcare) verwendet. Auf die Anode der Blottingkammer wurden drei Whatman-Papiere gelegt, auf denen die Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und drei weitere Whatman-Papiere folgten. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte für 70 min bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² und 50 V. Die Membran wurde für einen immunologischen Nachweis von Proteinen weiter verwendet (s. Kap. 5.2.23).

5.2.23 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Für den Nachweis von Proteinen über Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei RT in einer 5 %-igen Blockierlösung schüttelnd inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper (in 5 %-iger Blockierlösung) über Nacht bei 4° C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x 10 min mit 1 x TBS-T gewaschen und anschließend mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (in 5 %-iger Blockierlösung) für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss 3 x mit 1 x TBS-T, 1 x mit TBS und 1 x mit ddH₂O jeweils 10 min gewaschen. Anschließend wurde der Blot für 5 min in *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Lösung inkubiert. Nach Entfernen der ECL-Lösung wurden durch das Auflegen eines Röntgenfilms die entstandenen Signale sichtbar gemacht.

5.2.24 *In vivo* Lokalisationsstudien

Es wurden für *in vivo* Lokalisationsstudien in *P. tricornutum* eGFP-Fusionskonstrukte erstellt und mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (s. Kap. 5.2.24.4) analysiert. Die gencodierenden Sequenzen wurden aus genomischer oder cDNA (s. Kap. 5.2.4.1) amplifiziert und zumeist über *EcoRI/XbaI*-5' an *egfp* fusioniert und in den Vektor pPha NR über *EcoRI/HindIII*-Schnittstellen der MCS kloniert. Die Expression der Konstrukte erfolgte mittels Inkubation für zwei bis vier Tage auf nitrathaltigen f/2-Festmedium.

5.2.24.1 Self Assembling GFP nach Cabantous et al. 2005

Das System des Self Assembling GFPs beruht auf dem Prinzip der Teilung von GFP in zwei Fragmente: den beta-Stängen 1-10 (GFP1-10) und dem S11-Fragment (GFP11) bestehend aus dem beta-Strang 11. Diese sind alleine nicht in der Lage zu fluoreszieren. Befinden sich beide Fragmente jedoch in demselben Kompartiment einer Zelle, kommt es aufgrund der sehr hohen Affinität der Fragmente GFP1-10 GFP11 für das jeweilige andere Fragment zur Assemblierung und schließlich zur Rekonstitution der GFP-Fluoreszenz. Für das Self Assembling GFP System wurde der pPha 2x NR DUAL Vektor verwendet, der zwei induzierbare MCS besitzt. Für die Topologie Analyse wurde das GFP11-Fragment an das 3'-Ende von *pdz2* bzw. *pip1* und in die zweite MCS über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/HindIII*-kloniert, während als cytosolischer Marker das GFP1-10-Fragment in die zweite MCS über *SpeI/SacII* kloniert wurde.

Nach Transfektion der Self Assembling GFP Konstrukte erfolgte zur Selektion von positiven Klonen vor der Untersuchung am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop eine Induktion von 24 h. Über Kolonie-PCR wurde die genomische Integration der Fusionskonstrukte bei den Klonen getestet, bei denen keine Fluoreszenz detektiert werden konnte.

5.2.24.2 Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (BiFC)

Die Untersuchung von Protein-Protein Interaktion erfolgte durch bimolekulare Fluoreszenz Komplementation mittels Split-GFP-Konstrukten. Die Methode basiert ähnlich wie das Self Assembling GFP auf der Spaltung von GFP in zwei Fragmente. Die Fragmente für Split-GFP besitzen jedoch eine ähnliche Größe und assemblieren nicht wie beim Self Assembling GFP spontan, wenn diese in demselben Kompartiment vorliegen. Beim Split-GFP System können die zwei GFP-Fragmente (N-GFP und C-GFP) nur rekonstituieren, wenn zwei Proteine miteinander interagieren und die GFP-Fragmente in räumliche Nähe gebracht werden. Die Interaktion ist folglich aufgrund einer Fluoreszenz *in vivo* detektierbar. Für das Split-GFP System wurden die potentiellen Interaktionspartner am 5' an *n-gfp* bzw. *c-gfp* fusioniert und in den pPha 2xNR DUAL Vektor kloniert. Nach der Transfektion wurden die *P. tricornutum* Klone zur Expression der Fusionskonstrukte für 2-5 Tage auf nitrathaltigem f/2-Medium inkubiert und anschließend am

KLSM auf eine *in vivo* Lokalisation hin analysiert. Klone, bei denen keine Fluoreszenz detektiert werden konnte, wurden über Kolonie-PCRs hinsichtlich ihrer genomischen Integration der Fusionskonstrukte analysiert.

5.2.24.3 MDY-64 staining von *Phaeodactylum tricornutum*-Wildtypzellen nach Huang et al 2016

Die Fluoreszenzmarkierung der Vakuolenmembran von *P. tricornutum* erfolgte über den Vakuolenmarker MDY-64. Für die MDY-64-Behandlung wurde 1 µL MDY-64 (1 mM) zu 499 µL einer *P. tricornutum* Suspension (ca. 1×10^6 Zellen in f/2-Flüssigmedium) hinzugegeben und für 2 min bei RT inkubiert und anschließend am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht.

5.2.24.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die *in vivo* Analyse exprimierter eGFP-Reporterfusionsproteine erfolgte unter dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS SP2. Es wurden 6 µL einer Nitrat-induzierten biolistisch transformierten *P. tricornutum*-Kultur auf einen Objektträger gegeben und unter einem HCX PL APO 40x/1.25-0.75 Oil CS Objektiv fokussiert. Mittels Argon-Laser und Einsatz eines tripeldichroitischen Filters (TD 488/543/633) wurden GFP und Chlorophyll bei 488 nm angeregt. Die Detektion von eGFP-Fluoreszenz (500 - 520 nm) bzw. des Vakuolenmembranmarkers MDY-64 (490 – 510 nm) und der Autofluoreszenz der Plastide (625 - 720 nm) erfolgte durch Photomultiplier auf unterschiedlichen Kanälen. Die Aufnahmen wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ bearbeitet (s. Kap. 5.1.9).

5.2.25 Bioinformatische *in silico* Analysen

Die *in silico* Studien zur Identifizierung von potentiellen vakuolären Proteine in *P. tricornutum* erfolgten über zwei verschiedene Ansätze. Um Vakuolen-lokalisierte Proteine bioinformatisch zu ermitteln wurde in einem „gerichteten“ Ansatz ein Datensatz verwendet, der aus dem Genom von *A. thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/>) generiert wurde. Dieser Datensatz setzte sich aus Proteinsequenzen zusammen, die als lokalisierte Vakuolenproteine annotiert oder beim intrazellulären Transport von vakuolären Proteinen involviert sind. Über BLASTp wurde dieser Datensatz als Sequenzvorlage genutzt. Für den zweiten Ansatz diente eine Aminosäuresequenz (YGSI), die als Sequenzvorlage genutzt wurde.

Vorhergesagte Genommodelle der ermittelten Proteine wurden im Anschluss mithilfe von EST-Daten auf Vollständigkeit überprüft und ggf. korrigiert. Die Einordnung der authentischen Proteine in verschiedene Klassen erfolgte mithilfe der NCBI-CDS (Marchler-Bauer et al. 2017), in dem konservierte Proteindomänen vorhergesagt wurden. Die Einteilung in lösliche und membrangebundene Proteine erfolgte über das Vorhersagetool TOPCONS (Tsirigos et al. 2015), bei dem Sowohl potentielle Signalpeptide und Transmembrandomänen vorhergesagt wurden. Eine

zusätzliche Vorhersage einer N-terminalen Zielsteuerungssequenz erfolgte über den SignalP3.0 Algorithmus (SignalP-HMM euk Vorhersagen, „secretory“, cutoff Sprob = 0,4) (Bendtsen et al. 2004).

Die Untersuchung der Proteinsequenzen auf putative Dileucin- oder Tyrosinmotiven erfolgte über die *Eukaryotic linear motif resource* (Davey et al. 2012; van Roey et al. 2014). Hierbei wurden nur die Sequenzen von Proteinen verwendet, die *in vivo* in der Vakuolenmembran von *P. tricornutum* lokalisiert wurden.

5.2.26 Phylogenetische Stammbaumanalysen

Die Berechnung der phylogenetischen Stammbäume erfolgte über die Software MEGA7. Die Datensätze für phylogenetische Analysen wurden mithilfe von BLASTp generiert. Hierfür wurden die Sequenzen der Proteine verwendet, die *in vivo* in der Vakuole von *P. tricornutum* lokalisiert werden konnten. Diese Sequenzen dienten als Sequenzvorlage. Homologe Sequenzen, die aus der BLASTp-Analyse resultierten wurden ggf. mit weiteren homologen Sequenzen aus verschiedenen Gruppen (Mammalia, Rhizaria, Rhodophyta) erweitert. Sequenzen aus der Klasse der Prokaryoten wurden bei der Analyse nicht miteinbezogen. Über MEGA7 wurden für die Generierung phylogenetischer Stammbäume folgende Parameter verwendet: Statistische Methode: Maximum likelihood; Bootstrap mit 200 Replikationen; Substitutionsmodell= James Tayler-Thornton (JTT); Partielle Deletion mit 95 % *Site coverage cut off*.

6 Literaturverzeichnis

- Adl, Sina M.; Simpson, Alastair G. B.; Farmer, Mark A.; Andersen, Robert A.; Anderson, O. Roger; Barta, John R. et al. (2005): The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 52 (5), S. 399–451. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.
- Allen, Richard D.; Naitoh, Yutaka (2002): Osmoregulation and contractile vacuoles of protozoa. In: *International review of cytology* 215, S. 351–394.
- Andre, B. (1995): An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast (Chichester, England)* 11 (16), S. 1575–1611. DOI: 10.1002/yea.320111605.
- Antoine, J. C.; Prina, E.; Lang, T.; Courret, N. (1998): The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. In: *Trends in microbiology* 6 (10), S. 392–401.
- Apt, K. E.; Kroth-Pancic, P. G.; Grossman, A. R. (1996): Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Molecular & general genetics : MGG* 252 (5), S. 572–579.
- Archibald, John M. (2009): The puzzle of plastid evolution. In: *Current biology : CB* 19 (2), R81–8. DOI: 10.1016/j.cub.2008.11.067.
- Aridor, M.; Balch, W. E. (2000): Kinase signaling initiates coat complex II (COPII) recruitment and export from the mammalian endoplasmic reticulum. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (46), S. 35673–35676. DOI: 10.1074/jbc.C000449200.
- Aridor, M.; Fish, K. N.; Bannykh, S.; Weissman, J.; Roberts, T. H.; Lippincott-Schwartz, J.; Balch, W. E. (2001): The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. In: *The Journal of Cell Biology* 152 (1), S. 213–229.
- Armbrust, E. Virginia (2009): The life of diatoms in the world's oceans. In: *Nature* 459 (7244), S. 185–192. DOI: 10.1038/nature08057.
- Bäcker, Oliver (2016): Identifizierung von Phosphat assoziierten Genen und Lokalisierung von Proteinen des VTC Komplexes in *Phaeodactylum tricornutum*. Bachelorarbeit. Philipps Universität Marburg, Deutschland.
- Ballabio, Andrea (2016): The awesome lysosome. In: *EMBO molecular medicine* 8 (2), S. 73–76. DOI: 10.15252/emmm.201505966.
- Barlow, L. D.; Dacks, J. B. (2017): Seeing the endomembrane system for the trees. Evolutionary analysis highlights the importance of plants as models for eukaryotic membrane-trafficking. In: *Seminars in cell & developmental biology*. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.09.027.
- Barlowe, C. (2000): Traffic COPs of the early secretory pathway. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 1 (5), S. 371–377.
- Barlowe, C.; Schekman, R. (1993): SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. In: *Nature* 365 (6444), S. 347–349. DOI: 10.1038/365347a0.

- Baumgartner, F.; Wiek, S.; Paprotka, K.; Zauner, S.; Lingelbach, K. (2001): A point mutation in an unusual Sec7 domain is linked to brefeldin A resistance in a *Plasmodium falciparum* line generated by drug selection. In: *Molecular microbiology* 41 (5), S. 1151–1158.
- Baurain, Denis; Brinkmann, Henner; Petersen, Jörn; Rodríguez-Ezpeleta, Naiara; Stechmann, Alexandra; Demoulin, Vincent et al. (2010): Phylogenomic Evidence for Separate Acquisition of Plastids in Cryptophytes, Haptophytes, and Stramenopiles. In: *Mol Biol Evol* 27 (7), S. 1698–1709. DOI: 10.1093/molbev/msq059.
- BEATTIE, A.; HIRST, E. L.; PERCIVAL, E. (1961): Studies on the metabolism of the Chrysophyceae. Comparative structural investigations on leucosin (chrysolaminarin) separated from diatoms and laminarin from the brown algae. In: *The Biochemical journal* 79, S. 531–537.
- Becker, Burkhard; Hoef-Emden, Kerstin (2009): Evolution of vacuolar targeting in algae. In: *Botanica Marina* 52 (2), S. 117–128. DOI: 10.1515/BOT.2009.013.
- Beckers, Con J. M.; Block, Marc R.; Glick, Benjamin S.; Rothman, James E.; Balch, William E. (1989): Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. In: *Nature* 339 (6223), S. 397. DOI: 10.1038/339397a0.
- Bendtsen, Jannick Dyrlov; Nielsen, Henrik; Heijne, Gunnar von; Brunak, Søren (2004): Improved prediction of signal peptides. SignalP 3.0. In: *Journal of molecular biology* 340 (4), S. 783–795. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.05.028.
- Bodył, Andrzej; Stiller, John W.; Mackiewicz, Paweł (2009): Chromalveolate plastids. Direct descent or multiple endosymbioses? In: *Trends in Ecology & Evolution* 24 (3), S. 119–121. DOI: 10.1016/j.tree.2008.11.003.
- Boehm, M.; Bonifacino, J. S. (2001): Adaptins. The final recount. In: *Molecular biology of the cell* 12 (10), S. 2907–2920.
- Bolte, Kathrin; Bullmann, Lars; Hempel, Franziska; Bozarth, Andrew; Zauner, Stefan; Maier, Uwe-G (2009): Protein targeting into secondary plastids. In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 56 (1), S. 9–15. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2008.00370.x.
- Bolte, Susanne; Brown, Spencer; Satiat-Jeunemaitre, Béatrice (2004): The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rabmc is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells. In: *Journal of cell science* 117 (6), S. 943–954. DOI: 10.1242/jcs.00920.
- Bonifacino, Juan S.; Lippincott-Schwartz, Jennifer (2003): Coat proteins. Shaping membrane transport. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (5), S. 409. DOI: 10.1038/nrm1099.
- Bonifacino, Juan S.; Traub, Linton M. (2003): Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. In: *Annual review of biochemistry* 72, S. 395–447. DOI: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800.
- Bottanelli, Francesca; Foresti, Ombretta; Hanton, Sally; Denecke, Jürgen (2011): Vacuolar Transport in Tobacco Leaf Epidermis Cells Involves a Single Route for Soluble Cargo and Multiple Routes for Membrane Cargo. In: *The Plant cell* 23 (8), S. 3007–3025. DOI: 10.1105/tpc.111.085480.
- Bowler, Chris; Allen, Andrew E.; Badger, Jonathan H.; Grimwood, Jane; Jabbari, Kamel; Kuo, Alan et al. (2008): The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. In: *Nature* 456 (7219), S. 239–244. DOI: 10.1038/nature07410.

- Brandizzi, Federica; Frangne, Nathalie; Marc-Martin, Sophie; Hawes, Chris; Neuhaus, Jean-Marc; Paris, Nadine (2002): The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. In: *The Plant cell* 14 (5), S. 1077–1092.
- Brandizzi, Federica; Hanton, Sally; DaSilva, Luis L. Pinto; Boevink, Petra; Evans, David; Oparka, Karl et al. (2003): ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 34 (3), S. 269–281.
- Brillada, Carla; Rojas-Pierce, Marcela (2017): Vacuolar trafficking and biogenesis. A maturation in the field. In: *Current opinion in plant biology* 40, S. 77–81. DOI: 10.1016/j.pbi.2017.08.005.
- Brodsky, Frances M. (2012): Diversity of clathrin function. New tricks for an old protein. In: *Annual review of cell and developmental biology* 28, S. 309–336. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155716.
- Buchmann, Karin; Becker, Burkhard (2009): The system of contractile vacuoles in the green alga *Mesostigma viride* (Streptophyta). In: *Protist* 160 (3), S. 427–443. DOI: 10.1016/j.protis.2009.01.002.
- Burki, Fabien; Flegontov, Pavel; Obornik, Miroslav; Cihlar, Jaromir; Pain, Arnab; Lukes, Julius; Keeling, Patrick J. (2012a): Re-evaluating the green versus red signal in eukaryotes with secondary plastid of red algal origin. In: *Genome biology and evolution* 4 (6), S. 626–635. DOI: 10.1093/gbe/evs049.
- Burki, Fabien; Okamoto, Noriko; Pombert, Jean-Francois; Keeling, Patrick J. (2012b): The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes. Phylogenomic evidence for separate origins. In: *Proceedings. Biological sciences* 279 (1736), S. 2246–2254. DOI: 10.1098/rspb.2011.2301.
- Burki, Fabien; Shalchian-Tabrizi, Kamran; Minge, Marianne; Skjaeveland, Asmund; Nikolaev, Sergey I.; Jakobsen, Kjetill S.; Pawlowski, Jan (2007): Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. In: *PloS one* 2 (8), e790. DOI: 10.1371/journal.pone.0000790.
- Büttner, Michael; Sauer, Norbert (2000): Monosaccharide transporters in plants. Structure, function and physiology. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465 (1-2), S. 263–274. DOI: 10.1016/S0005-2736(00)00143-7.
- Cabantous, Stéphanie; Terwilliger, Thomas C.; Waldo, Geoffrey S. (2005): Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. In: *Nature Biotechnology* 23 (1), S. 102. DOI: 10.1038/nbt1044.
- Carter, Clay; Pan, Songqin; Zouhar, Jan; Avila, Emily L.; Girke, Thomas; Raikhel, Natasha V. (2004): The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. In: *The Plant cell* 16 (12), S. 3285–3303. DOI: 10.1105/tpc.104.027078.
- Cavalier-Smith, T. (1987): The Origin of Eukaryote and Archaeobacterial Cells. In: *Ann NY Acad Sci* 503 (1 Endocytobiolo), S. 17–54. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1987.tb40596.x.
- Cavalier-Smith, T. (1988): Origin of the cell nucleus. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 9 (2-3), S. 72–78. DOI: 10.1002/bies.950090209.
- Cavalier-Smith, T. (1989): Molecular phylogeny. Archaeobacteria and Archezoa. In: *Nature* 339 (6220), l00-1. DOI: 10.1038/339100a0.

- Cavalier-Smith, T. (1999): Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis. Euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 46 (4), S. 347–366.
- Cavalier-Smith, T. (2000): Membrane heredity and early chloroplast evolution. In: *Trends in plant science* 5 (4), S. 174–182.
- Cavalier-Smith, T. (2002): Nucleomorphs. Enslaved algal nuclei. In: *Current Opinion in Microbiology* 5 (6), S. 612–619.
- Cavalier-Smith, Thomas; Chao, Ema E-Y (2006): Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). In: *Journal of molecular evolution* 62 (4), S. 388–420. DOI: 10.1007/s00239-004-0353-8.
- Chan, Cheong Xin; Yang, Eun Chan; Banerjee, Titas; Yoon, Hwan Su; Martone, Patrick T.; Estevez, Jose M.; Bhattacharya, Debashish (2011): Red and green algal monophyly and extensive gene sharing found in a rich repertoire of red algal genes. In: *Current biology : CB* 21 (4), S. 328–333. DOI: 10.1016/j.cub.2011.01.037.
- Chauton, Matilde Skogen; Winge, Per; Brembu, Tore; Vadstein, Olav; Bones, Atle M. (2013): Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* acclimated to light/dark cycles. In: *Plant physiology* 161 (2), S. 1034–1048. DOI: 10.1104/pp.112.206177.
- Chiovitti, Anthony; Molino, Paul; Crawford, Simon A.; Teng, Rongwei; Spurck, Timothy; Wetherbee, Richard (2004): The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides. In: *European Journal of Phycology* 39 (2), S. 117–128. DOI: 10.1080/0967026042000201885.
- Chrispeels, M. J. (1991): Sorting of Proteins in The Secretory System. In: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42 (1), S. 21–53. DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.000321.
- Chugh, Monika; Sundararaman, Vidhya; Kumar, Saravanan; Reddy, Vanga S.; Siddiqui, Waseem A.; Stuart, Kenneth D.; Malhotra, Pawan (2013): Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (14), S. 5392–5397. DOI: 10.1073/pnas.1218412110.
- Cosson, P.; Letourneur, F. (1994): Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. In: *Science* 263 (5153), S. 1629–1631. DOI: 10.1126/science.8128252.
- Cowles, C. R.; Odorizzi, G.; Payne, G. S.; Emr, S. D. (1997): The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. In: *Cell* 91 (1), S. 109–118.
- Cui, Yong; Zhao, Qiong; Gao, Caiji; Ding, Yu; Zeng, Yonglun; Ueda, Takashi et al. (2014): Activation of the Rab7 GTPase by the MON1-CCZ1 Complex Is Essential for PVC-to-Vacuole Trafficking and Plant Growth in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 26 (5), S. 2080–2097. DOI: 10.1105/tpc.114.123141.
- Czempinski, Katrin; Frachisse, Jean-Marie; Maurel, Christophe; Barbier-Brygoo, Helene; Mueller-Roeber, Bernd (2002): Vacuolar membrane localization of the Arabidopsis 'two-pore' K⁺ channel KCO1. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 29 (6), S. 809–820.

- Daboussi, Fayza; Leduc, Sophie; Marechal, Alan; Dubois, Gwendoline; Guyot, Valerie; Perez-Michaut, Christophe et al. (2014): Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. In: *Nature Communications* 5, S. 3831. DOI: 10.1038/ncomms4831.
- Dacks, J. B.; Doolittle, W. F. (2001): Reconstructing/deconstructing the earliest eukaryotes. How comparative genomics can help. In: *Cell* 107 (4), S. 419–425.
- Dacks, Joel B.; Peden, Andrew A.; Field, Mark C. (2009): Evolution of specificity in the eukaryotic endomembrane system. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 41 (2), S. 330–340. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.08.041.
- Dacks, Joel B.; Poon, Pak P.; Field, Mark C. (2008): Phylogeny of endocytic components yields insight into the process of nonendosymbiotic organelle evolution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2), S. 588–593. DOI: 10.1073/pnas.0707318105.
- daSilva, Luis L. P.; Taylor, J. Philip; Hadlington, Jane L.; Hanton, Sally L.; Snowden, Christopher J.; Fox, Sarah J. et al. (2005): Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting. In: *The Plant cell* 17 (1), S. 132–148. DOI: 10.1105/tpc.104.026351.
- Davey, Norman E.; van Roey, Kim; Weatheritt, Robert J.; Toedt, Grischa; Uyar, Bora; Altenberg, Brigitte et al. (2012): Attributes of short linear motifs. In: *Molecular bioSystems* 8 (1), S. 268–281. DOI: 10.1039/c1mb05231d.
- Debeaujon, I.; Peeters, A. J.; Leon-Kloosterziel, K. M.; Koornneef, M. (2001): The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. In: *The Plant cell* 13 (4), S. 853–871.
- Del Sorbo, G.; Andrade, A. C.; van Nistelrooy, J. G.; van Kan, J. A.; Balzi, E.; Waard, M. A. de (1997): Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. In: *Molecular & general genetics : MGG* 254 (4), S. 417–426.
- Del Sorbo, G.; Schoonbeek, H.; Waard, M. A. de (2000): Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. In: *Fungal genetics and biology : FG & B* 30 (1), S. 1–15.
- Dell'Angelica, Esteban C. (2009): AP-3-dependent trafficking and disease. The first decade. In: *Current opinion in cell biology* 21 (4), S. 552–559. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.04.014.
- Deloche, O.; Yeung, B. G.; Payne, G. S.; Schekman, R. (2001): Vps10p transport from the trans-Golgi network to the endosome is mediated by clathrin-coated vesicles. In: *Molecular biology of the cell* 12 (2), S. 475–485.
- Denecke, J.; Rycke, R. de; Botterman, J. (1992): Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. In: *The EMBO journal* 11 (6), S. 2345–2355.
- Dersch, Josefine (2016): Identifikation und Lokalisation von Membranproteinen aus der Major Facilitator Superfamilie und der ATP-Binding-Cassette Superfamilie. Bachelorarbeit. Philipps Universität Marburg, Deutschland.

- Dombrowski, J. E.; Schroeder, M. R.; Bednarek, S. Y.; Raikhel, N. V. (1993): Determination of the functional elements within the vacuolar targeting signal of barley lectin. In: *The Plant cell* 5 (5), S. 587–596.
- Donaldson, J. G.; Cassel, D.; Kahn, R. A.; Klausner, R. D. (1992a): ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein beta-COP to Golgi membranes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (14), S. 6408–6412.
- Donaldson, J. G.; Finazzi, D.; Klausner, R. D. (1992b): Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. In: *Nature* 360 (6402), S. 350–352. DOI: 10.1038/360350a0.
- Dorrell, Richard G.; Gile, Gillian; McCallum, Giselle; Méheust, Raphaël; Baptiste, Eric P.; Klinger, Christen M. et al. (2017): Chimeric origins of ochrophytes and haptophytes revealed through an ancient plastid proteome. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.23717.
- Dorrell, Richard G.; Smith, Alison G. (2011): Do red and green make brown? Perspectives on plastid acquisitions within chromalveolates. In: *Eukaryotic cell* 10 (7), S. 856–868. DOI: 10.1128/EC.00326-10.
- Douglas, S. E.; Turner, S. (1991): Molecular evidence for the origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor. In: *Journal of molecular evolution* 33 (3), S. 267–273.
- DOYLE, J. J. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. In: *Focus* 12, S. 13–15.
- Dunkel, Marcel; Latz, Andreas; Schumacher, Karin; Muller, Thomas; Becker, Dirk; Hedrich, Rainer (2008): Targeting of vacuolar membrane localized members of the TPK channel family. In: *Molecular Plant* 1 (6), S. 938–949. DOI: 10.1093/mp/ssn064.
- Endler, Anne; Meyer, Stefan; Schelbert, Silvia; Schneider, Thomas; Weschke, Winfriede; Peters, Shaun W. et al. (2006): Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. In: *Plant physiology* 141 (1), S. 196–207. DOI: 10.1104/pp.106.079533.
- Feraru, Elena; Paciorek, Tomasz; Feraru, Mugurel I.; Zwiewka, Marta; Groodt, Ruth De; Rycke, Riet De et al. (2010): The AP-3 β Adaptin Mediates the Biogenesis and Function of Lytic Vacuoles in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 22 (8), S. 2812–2824. DOI: 10.1105/tpc.110.075424.
- Field, Mark C.; Dacks, Joel B. (2009): First and last ancestors. Reconstructing evolution of the endomembrane system with ESCRTs, vesicle coat proteins, and nuclear pore complexes. In: *Current opinion in cell biology* 21 (1), S. 4–13. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.12.004.
- Ford, C. W.; Percival, E. E. (1965): The carbohydrates of *Phasodactylum tricornutum*. 1. Preliminary examination of the organism, and characterisation of low molecular weight material and of a glucan.
- Foresti, Ombretta; Denecke, Jurgen (2008): Intermediate organelles of the plant secretory pathway. Identity and function. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9 (10), S. 1599–1612. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2008.00791.x.
- Foresti, Ombretta; Gershlick, David C.; Bottanelli, Francesca; Hummel, Eric; Hawes, Chris; Denecke, Jurgen (2010): A recycling-defective vacuolar sorting receptor reveals an intermediate

compartment situated between prevacuoles and vacuoles in tobacco. In: *The Plant cell* 22 (12), S. 3992–4008. DOI: 10.1105/tpc.110.078436.

Friend, D. S.; Farquhar, M. G. (1967): Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens. In: *The Journal of Cell Biology* 35 (2), S. 357–376.

Frigerio, Lorenzo; Hinz, Giselbert; Robinson, David G. (2008): Multiple vacuoles in plant cells. Rule or exception? In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9 (10), S. 1564–1570. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2008.00776.x.

Fuji, Kentaro; Shirakawa, Makoto; Shimono, Yuki; Kunieda, Tadashi; Fukao, Yoichiro; Koumoto, Yasuko et al. (2016): The Adaptor Complex AP-4 Regulates Vacuolar Protein Sorting at the trans-Golgi Network by Interacting with VACUOLAR SORTING RECEPTOR1. In: *Plant physiology* 170 (1), S. 211–219. DOI: 10.1104/pp.15.00869.

Galili, G.; Sengupta-Gopalan, C.; Ceriotti, A. (1998): The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. In: *Plant molecular biology* 38 (1-2), S. 1–29.

Gao, Caiji; Cai, Yi; Wang, Yejun; Kang, Byung-Ho; Aniento, Fernando; Robinson, David G.; Jiang, Liwen (2014): Retention mechanisms for ER and Golgi membrane proteins. In: *Trends in Plant Science* 19 (8), S. 508–515. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.04.004.

Gavrilov, A. A.; Razin, S. V. (2015): Compartmentalization of the cell nucleus and spatial organization of the genome. In: *Molecular Biology* 49 (1), S. 21–39. DOI: 10.1134/S0026893315010033.

Geisler, Carsten; Dietrich, Jes; Nielsen, Bodil L.; Kastrup, Jesper; Lauritsen, Jens Peter H.; Ødum, Niels; Christensen, Mette D. (1998): Leucine-based Receptor Sorting Motifs Are Dependent on the Spacing Relative to the Plasma Membrane. In: *J. Biol. Chem.* 273 (33), S. 21316–21323. DOI: 10.1074/jbc.273.33.21316.

Gentil, J.; Hempel, F.; Moog, D.; Zauner, S.; Maier, U. G. (2017): Review. Origin of complex algae by secondary endosymbiosis: a journey through time. In: *Protoplasma* 254 (5), S. 1835–1843. DOI: 10.1007/s00709-017-1098-8.

Gibbs, S. P. (1979): The route of entry of cytoplasmically synthesized proteins into chloroplasts of algae possessing chloroplast ER. In: *Journal of cell science* 35, S. 253–266.

Gibson, Daniel G. (2009): Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. In: *Nucleic acids research* 37 (20), S. 6984–6990. DOI: 10.1093/nar/gkp687.

Giraud, Claudio G.; Maccioni, Hugo J.F. (2003): Endoplasmic Reticulum Export of Glycosyltransferases Depends on Interaction of a Cytoplasmic Dibasic Motif with Sar1. In: *Molecular biology of the cell* 14 (9), S. 3753–3766. DOI: 10.1091/mbc.E03-02-0101.

Glick, Benjamin S.; Rothman, James E. (1987): Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. In: *Nature* 326 (6110), S. 309. DOI: 10.1038/326309a0.

Gobert, Anthony; Isayenkov, Stanislav; Voelker, Camilla; Czempinski, Katrin; Maathuis, Frans J. M. (2007): The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (25), S. 10726–10731. DOI: 10.1073/pnas.0702595104.

- Gonzalez, Nicola H.; Felsner, Gregor; Schramm, Frederic D.; Klingl, Andreas; Maier, Uwe-G; Bolte, Kathrin (2011): A single peroxisomal targeting signal mediates matrix protein import in diatoms. In: *PloS one* 6 (9), e25316. DOI: 10.1371/journal.pone.0025316.
- González, Wendy; Valdebenito, Braulio; Caballero, Julio; Riadi, Gonzalo; Riedelsberger, Janin; Martínez, Gonzalo et al. (2015): K₂p channels in plants and animals. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467 (5), S. 1091–1104. DOI: 10.1007/s00424-014-1638-4.
- Gould, Sven B.; Garg, Sriram G.; Martin, William F. (2016): Bacterial Vesicle Secretion and the Evolutionary Origin of the Eukaryotic Endomembrane System. In: *Trends in microbiology* 24 (7), S. 525–534. DOI: 10.1016/j.tim.2016.03.005.
- Gould, Sven B.; Waller, Ross F.; McFadden, Geoffrey I. (2008): Plastid evolution. In: *Annual review of plant biology* 59, S. 491–517. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092915.
- Granum, Espen; RAVEN, JOHN A.; Leegood, Richard C. (2005): How do marine diatoms fix 10 billion tonnes of inorganic carbon per year? In: *Can. J. Bot.* 83 (7), S. 898–908. DOI: 10.1139/b05-077.
- Greenwood, A. D.; Griffiths, H. B.; Santore, U. J. (1977): Chloroplasts and cell compartments in cryptophyceae. In: *Brit Phycol* 12, S. 119.
- Guo, Yusong; Zanetti, Giulia; Schekman, Randy (2013): A novel GTP-binding protein-adaptor protein complex responsible for export of Vangl2 from the trans Golgi network. In: *eLife* 2, e00160. DOI: 10.7554/eLife.00160.
- Hackett, Jeremiah D.; Yoon, Hwan Su; Li, Shenglan; Reyes-Prieto, Adrian; Rümmele, Susanne E.; Bhattacharya, Debashish (2007): Phylogenomic Analysis Supports the Monophyly of Cryptophytes and Haptophytes and the Association of Rhizaria with Chromalveolates. In: *Mol Biol Evol* 24 (8), S. 1702–1713. DOI: 10.1093/molbev/msm089.
- Hamilton, Trinity L.; Bryant, Donald A.; Macalady, Jennifer L. (2016): The role of biology in planetary evolution. Cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. In: *Environmental Microbiology* 18 (2), S. 325–340. DOI: 10.1111/1462-2920.13118.
- Happel, Carina (2014): Lokalisationsstudien von Proteinen der vakuolenähnlichen Strukturen und gene silencing durch artifizielle microRNA in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*. Bachelorarbeit. Philipps Universität Marburg, Deutschland.
- Happel, Nicole; Honing, Stefan; Neuhaus, Jean-Marc; Paris, Nadine; Robinson, David G.; Holstein, Susanne E. H. (2004): Arabidopsis mu A-adaptin interacts with the tyrosine motif of the vacuolar sorting receptor VSR-PS1. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 37 (5), S. 678–693.
- Harper, James T.; Keeling, Patrick J. (2003): Nucleus-Encoded, Plastid-Targeted Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Indicates a Single Origin for Chromalveolate Plastids. In: *Mol Biol Evol* 20 (10), S. 1730–1735. DOI: 10.1093/molbev/msg195.
- Harper, James T.; Waanders, Esmé; Keeling, Patrick J. (2005): On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (1), S. 487–496. DOI: 10.1099/ijs.0.63216-0.
- Hawes, Chris; Brandizzi, Federica; Andreeva, Alexandra (1999): Endomembranes and vesicle trafficking. In: *Current opinion in plant biology* 2 (6), S. 454–461. DOI: 10.1016/S1369-5266(99)00023-0.

- Hempel, Franziska; Bullmann, Lars; Lau, Julia; Zauner, Stefan; Maier, Uwe G. (2009): ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. In: *Molecular biology and evolution* 26 (8), S. 1781–1790. DOI: 10.1093/molbev/msp079.
- Heuser, J.; Zhu, Q.; Clarke, M. (1993): Proton pumps populate the contractile vacuoles of *Dictyostelium amoebae*. In: *The Journal of Cell Biology* 121 (6), S. 1311–1327. DOI: 10.1083/jcb.121.6.1311.
- Hibberd, David J.; Norris, Richard E. (1984): CYTOLOGY AND ULTRASTRUCTURE OF CHLORARACHNION REPTANS (CHLORARACHNIOPHYTA DIVISIO NOVA, CHLORARACHNIOPHYCEAE CLASSIS NOVA). In: *Journal of Phycology* 20 (2), S. 310–330. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1984.00310.x.
- Hicke, L.; Yoshihisa, T.; Schekman, R. (1992): Sec23p and a novel 105-kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. In: *Molecular biology of the cell* 3 (6), S. 667–676.
- Hinz, Giselbert; Colanesi, Sarah; Hillmer, Stefan; Rogers, John C.; Robinson, David G. (2007): Localization of Vacuolar Transport Receptors and Cargo Proteins in the Golgi Apparatus of Developing Arabidopsis Embryos. In: *Traffic* 8 (10), S. 1452–1464. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00625.x.
- Hirst, J.; Robinson, M. S. (1998): Clathrin and adaptors. In: *Biochimica et biophysica acta* 1404 (1-2), S. 173–193.
- Hirst, Jennifer; Borner, Georg H. H.; Edgar, James; Hein, Marco Y.; Mann, Matthias; Buchholz, Frank et al. (2013): Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. In: *Molecular biology of the cell* 24 (16), S. 2558–2569. DOI: 10.1091/mbc.E13-03-0170.
- Höfte, H.; Chrispeels, M. J. (1992): Protein sorting to the vacuolar membrane. In: *The Plant cell* 4 (8), S. 995–1004. DOI: 10.1105/tpc.4.8.995.
- Hohl, I.; Robinson, D. G.; Chrispeels, M. J.; Hinz, G. (1996): Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. In: *Journal of cell science* 109 (Pt 10), S. 2539–2550.
- Holwerda, B. C.; Padgett, H. S.; Rogers, J. C. (1992): Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. In: *The Plant cell* 4 (3), S. 307–318. DOI: 10.1105/tpc.4.3.307.
- Huang, Weichao; Rio Bartulos, Carolina; Kroth, Peter G. (2016): Diatom Vacuolar 1,6-beta-Transglycosylases can Functionally Complement the Respective Yeast Mutants. In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 63 (4), S. 536–546. DOI: 10.1111/jeu.12298.
- Isayenkov, S. V. (2014): Plant vacuoles. Physiological roles and mechanisms of vacuolar sorting and vesicular trafficking. In: *Cytology and Genetics* 48 (2), S. 127–137. DOI: 10.3103/S0095452714020042.
- Isayenkov, Stanislav; Isner, Jean-Charles; Maathuis, Frans J. M. (2011): Membrane localization diversity of TPK channels and their physiological role. In: *Plant signaling & behavior* 6 (8), S. 1201–1204. DOI: 10.4161/psb.6.8.15808.
- Jackson, C. L.; Casanova, J. E. (2000): Turning on ARF. The Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. In: *Trends in Cell Biology* 10 (2), S. 60–67.

- Jackson, Christopher; Knoll, Andrew H.; Chan, Cheong Xin; Verbruggen, Heroen (2018): Plastid phylogenomics with broad taxon sampling further elucidates the distinct evolutionary origins and timing of secondary green plastids. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 1523. DOI: 10.1038/s41598-017-18805-w.
- Jackson, Lauren P.; Kelly, Bernard T.; McCoy, Airlie J.; Gaffry, Thomas; James, Leo C.; Collins, Brett M. et al. (2010): A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. In: *Cell* 141 (7), S. 1220–1229. DOI: 10.1016/j.cell.2010.05.006.
- Karas, Bogumil J.; Diner, Rachel E.; Lefebvre, Stephane C.; McQuaid, Jeff; Phillips, Alex P. R.; Noddings, Chari M. et al. (2015): Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. In: *Nature Communications* 6, S. 6925. DOI: 10.1038/ncomms7925.
- Kawachi, Miki; Kobae, Yoshihiro; Mimura, Tetsuro; Maeshima, Masayoshi (2008): Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn(2+)/H(+) antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (13), S. 8374–8383. DOI: 10.1074/jbc.M707646200.
- Keeling, Patrick J. (2009): Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis. In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 56 (1), S. 1–8. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2008.00371.x.
- Ketudat Cairns, James R.; Esen, Asim (2010): β -Glucosidases. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67 (20), S. 3389–3405. DOI: 10.1007/s00018-010-0399-2.
- Ketudat Cairns, James R.; Mahong, Bancha; Baiya, Supaporn; Jeon, Jong-Seong (2015): β -Glucosidases. Multitasking, moonlighting or simply misunderstood? In: *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 241, S. 246–259. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.10.014.
- Kilian, Oliver; Kroth, Peter G. (2005): Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. In: *The Plant Journal* 41 (2), S. 175–183. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2004.02294.x.
- Kirsch, T.; Paris, N.; Butler, J. M.; Beevers, L.; Rogers, J. C. (1994): Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (8), S. 3403–3407.
- Kleine, Tatjana; Maier, Uwe G.; Leister, Dario (2009): DNA transfer from organelles to the nucleus. The idiosyncratic genetics of endosymbiosis. In: *Annual review of plant biology* 60, S. 115–138. DOI: 10.1146/annurev.arplant.043008.092119.
- Klemens, Patrick A. W.; Patzke, Kathrin; Trentmann, Oliver; Poschet, Gernot; Büttner, Michael; Schulz, Alexander et al. (2014): Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination. In: *New Phytologist* 202 (1), S. 188–197. DOI: 10.1111/nph.12642.
- Koide, Y.; Matsuoka, K.; Ohto, M.; Nakamura, K. (1999): The N-terminal propeptide and the C terminus of the precursor to 20-kilo-dalton potato tuber protein can function as different types of vacuolar sorting signals. In: *Plant & cell physiology* 40 (11), S. 1152–1159.

- Kostygov, Alexei Y.; Dobáková, Eva; Grybchuk-Ieremenko, Anastasiia; Váhala, Dalibor; Maslov, Dmitri A.; Votýpka, Jan et al. (2016): Novel Trypanosomatid-Bacterium Association. Evolution of Endosymbiosis in Action. In: *mBio* 7 (2), e01985-15. DOI: 10.1128/mBio.01985-15.
- Kraut, J. (1977): Serine proteases. Structure and mechanism of catalysis. In: *Annual review of biochemistry* 46, S. 331–358. DOI: 10.1146/annurev.bi.46.070177.001555.
- Kroth, Peter G.; Chiovitti, Anthony; Gruber, Ansgar; Martin-Jezequel, Veronique; Mock, Thomas; Parker, Micaela Schnitzler et al. (2008): A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. In: *PloS one* 3 (1), e1426. DOI: 10.1371/journal.pone.0001426.
- Kunzl, Fabian; Fruholz, Simone; Fassler, Florian; Li, Beibei; Pimpl, Peter (2016): Receptor-mediated sorting of soluble vacuolar proteins ends at the trans-Golgi network/early endosome. In: *Nature plants* 2, S. 16017. DOI: 10.1038/nplants.2016.17.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lage, Hermann (2003): ABC-transporters. Implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. In: *International journal of antimicrobial agents* 22 (3), S. 188–199.
- Lake, J. A.; Rivera, M. C. (1994): Was the nucleus the first endosymbiont? In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (8), S. 2880–2881. DOI: 10.1073/pnas.91.8.2880.
- Lam, Sheung Kwan; Siu, Ching Lung; Hillmer, Stefan; Jang, Seonghoe; An, Gynheung; Robinson, David G.; Jiang, Liwen (2007): Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. In: *The Plant cell* 19 (1), S. 296–319. DOI: 10.1105/tpc.106.045708.
- Lander, Noelia; Cordeiro, Ciro; Huang, Guozhong; Docampo, Roberto (2016): Polyphosphate and acidocalcisomes. In: *Biochemical Society transactions* 44 (1), S. 1–6. DOI: 10.1042/BST20150193.
- Larisch, Nina; Schulze, Christina; Galione, Antony; Dietrich, Petra (2012): An N-terminal dileucine motif directs two-pore channels to the tonoplast of plant cells. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13 (7), S. 1012–1022. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2012.01366.x.
- Latz, A.; Becker, D.; Hekman, M.; Muller, T.; Beyhl, D.; Marten, I. et al. (2007): TPK1, a Ca²⁺-regulated Arabidopsis vacuole two-pore K⁺ channel is activated by 14-3-3 proteins. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 52 (3), S. 449–459. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03255.x.
- Law, Christopher J.; Maloney, Peter C.; Wang, Da-Neng (2008): Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. In: *Annual review of microbiology* 62, S. 289–305. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093329.
- Leidhold, Claudia; Voos, Wolfgang (2007): Chaperones and proteases--guardians of protein integrity in eukaryotic organelles. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1113, S. 72–86. DOI: 10.1196/annals.1391.011.
- Lemieux, M. Joanne (2007): Eukaryotic major facilitator superfamily transporter modeling based on the prokaryotic GlpT crystal structure. In: *Molecular membrane biology* 24 (5-6), S. 333–341. DOI: 10.1080/09687680701496507.

- Letourneur, F.; Klausner, R. D. (1992): A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. In: *Cell* 69 (7), S. 1143–1157.
- Lin, Hung-Yun; Shih, Chi-Yu; Liu, Hung-Chun; Chang, Jeng; Chen, Ying-Lan; Chen, Yet-Ran et al. (2013): Identification and characterization of an extracellular alkaline phosphatase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* 15 (4), S. 425–436. DOI: 10.1007/s10126-013-9494-3.
- Lingelbach, K.; Joiner, K. A. (1998): The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma. An unusual compartment in infected cells. In: *Journal of cell science* 111 (Pt 11), S. 1467–1475.
- Liu, Xiaojuan; Hempel, Franziska; Stork, Simone; Bolte, Kathrin; Moog, Daniel; Heimerl, Thomas et al. (2016): Addressing various compartments of the diatom model organism *Phaeodactylum tricornutum* via sub-cellular marker proteins. In: *Algal Research* 20, S. 249–257. DOI: 10.1016/j.algal.2016.10.018.
- Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James (2000): Overview of the Secretory Pathway: W. H. Freeman.
- Luo, Fang; Fong, Yu Hang; Zeng, Yonglun; Shen, Jinbo; Jiang, Liwen; Wong, Kam-Bo (2014): How Vacuolar Sorting Receptor Proteins Interact with Their Cargo Proteins. Crystal Structures of Apo and Cargo-Bound Forms of the Protease-Associated Domain from an Arabidopsis Vacuolar Sorting Receptor. In: *The Plant cell* 26 (9), S. 3693–3708. DOI: 10.1105/tpc.114.129940.
- Lyons, Timothy W.; Reinhard, Christopher T.; Planavsky, Noah J. (2014): The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. In: *Nature* 506 (7488), S. 307–315. DOI: 10.1038/nature13068.
- Maier, U. G.; Douglas, S. E.; Cavalier-Smith, T. (2000): The nucleo morph genomes of cryptophytes and chlorarachniophytes. In: *Protist* 151 (2), S. 103–109. DOI: 10.1078/1434-4610-00011.
- Maier, Uwe G.; Zauner, Stefan; Hempel, Franziska (2015): Protein import into complex plastids. Cellular organization of higher complexity. In: *European Journal of Cell Biology* 94 (7-9), S. 340–348. DOI: 10.1016/j.ejcb.2015.05.008.
- Malhotra, V.; Orci, L.; Glick, B. S.; Block, M. R.; Rothman, J. E. (1988): Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. In: *Cell* 54 (2), S. 221–227.
- Marchler-Bauer, Aron; Bo, Yu; Han, Lianyi; He, Jane; Lanczycki, Christopher J.; Lu, Shennan et al. (2017): CDD/SPARCLE. Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. In: *Nucleic acids research* 45 (D1), D200–D203. DOI: 10.1093/nar/gkw1129.
- Marcos Lousa, Carine de; Denecke, Jurgen (2016): Lysosomal and vacuolar sorting. Not so different after all! In: *Biochemical Society transactions* 44 (3), S. 891–897. DOI: 10.1042/BST20160050.
- Marcos Lousa, Carine de; Gershlick, David C.; Denecke, Jurgen (2012): Mechanisms and concepts paving the way towards a complete transport cycle of plant vacuolar sorting receptors. In: *The Plant cell* 24 (5), S. 1714–1732. DOI: 10.1105/tpc.112.095679.

- Marger, Michael D.; Saier, Milton H. (1993): A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. In: *Trends in Biochemical Sciences* 18 (1), S. 13–20. DOI: 10.1016/0968-0004(93)90081-W.
- Margulis, Lynn (1970): Origin of eukaryotic cells evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth. New Haven: Yale University Press. Online verfügbar unter <http://worldcatlibraries.org/wcpa/oclc/108043>.
- Marin, Birger; Nowack, Eva C. M.; Melkonian, Michael (2005): A plastid in the making. Evidence for a second primary endosymbiosis. In: *Protist* 156 (4), S. 425–432. DOI: 10.1016/j.protis.2005.09.001.
- Marinova, Krasimira; Pourcel, Lucille; Weder, Barbara; Schwarz, Michael; Barron, Denis; Routaboul, Jean-Marc et al. (2007): The Arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺ - antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. In: *The Plant cell* 19 (6), S. 2023–2038. DOI: 10.1105/tpc.106.046029.
- Martin, Herrmann (1998): Gene transfer from organelles to the nucleus. How much, what happens, and Why? In: *Plant physiology* 118 (1), S. 9–17.
- Martin, William; Koonin, Eugene V. (2006): Introns and the origin of nucleus–cytosol compartmentalization. In: *Nature* 440 (7080), S. 41. DOI: 10.1038/nature04531.
- Martin, William; Rujan, Tamas; Richly, Erik; Hansen, Andrea; Cornelsen, Sabine; Lins, Thomas et al. (2002): Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19), S. 12246–12251. DOI: 10.1073/pnas.182432999.
- Martin, William F.; Garg, Sriram; Zimorski, Verena (2015): Endosymbiotic theories for eukaryote origin. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 370 (1678), S. 20140330. DOI: 10.1098/rstb.2014.0330.
- Martinoia, Enrico; Maeshima, Masayoshi; Neuhaus, H. Ekkehard (2007): Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. In: *Journal of experimental botany* 58 (1), S. 83–102. DOI: 10.1093/jxb/erl183.
- Martinoia, Enrico; Meyer, Stefan; Angeli, Alexis de; Nagy, Reka (2012): Vacuolar transporters in their physiological context. In: *Annual review of plant biology* 63, S. 183–213. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105608.
- Martoglio, B.; Dobberstein, B. (1998): Signal sequences. More than just greasy peptides. In: *Trends in Cell Biology* 8 (10), S. 410–415.
- Marty, F. (1999): Plant Vacuoles. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 11 (4), S. 587–600. DOI: 10.1105/tpc.11.4.587.
- Mattera, Rafael; Boehm, Markus; Chaudhuri, Rittik; Prabhu, Yogikala; Bonifacino, Juan S. (2011): Conservation and Diversification of Dileucine Signal Recognition by Adaptor Protein (AP) Complex Variants. In: *J. Biol. Chem.* 286 (3), S. 2022–2030. DOI: 10.1074/jbc.M110.197178.
- Maurer, Michael (2014): Die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* als Expressionssystem für rekombinante Proteine. Bachelorarbeit. Philipps Universität Marburg, Deutschland.

- Mereschkowsky, C. (1905): Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. In: *Biol. Centralbl.* 25, S. 593–604.
- Moog, D. (2012): Charakterisierung eines minimierten eukaryoten Cytoplasmas - das periplastidäre Kompartiment der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*. Dissertation. Philipps Universität Marburg, Deutschland. Zellbiologie 1.
- Moog, Daniel; Rensing, Stefan A.; Archibald, John M.; Maier, Uwe G.; Ullrich, Kristian K. (2015): Localization and Evolution of Putative Triose Phosphate Translocators in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Genome biology and evolution* 7 (11), S. 2955–2969. DOI: 10.1093/gbe/evv190.
- Moreira, David; López-García, Purificación (1998): Symbiosis Between Methanogenic Archaea and δ -Proteobacteria as the Origin of Eukaryotes. The Syntrophic Hypothesis. In: *Journal of molecular evolution* 47 (5), S. 517–530. DOI: 10.1007/PL00006408.
- Morrissey, Joe; Sutak, Robert; Paz-Yepes, Javier; Tanaka, Atsuko; Moustafa, Ahmed; Veluchamy, Alaguraj et al. (2015): A novel protein, ubiquitous in marine phytoplankton, concentrates iron at the cell surface and facilitates uptake. In: *Current biology : CB* 25 (3), S. 364–371. DOI: 10.1016/j.cub.2014.12.004.
- Moustafa, Ahmed; Beszteri, Bank; Maier, Uwe G.; Bowler, Chris; Valentin, Klaus; Bhattacharya, Debashish (2009): Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5935), S. 1724–1726. DOI: 10.1126/science.1172983.
- Mulki-djanian, Armen Y.; Makarova, Kira S.; Galperin, Michael Y.; Koonin, Eugene V. (2007 Nov): Inventing the dynamo machine. The evolution of the F-type and V-type ATPases. England.
- Muller, Oliver; Bayer, Martin J.; Peters, Christopher; Andersen, Jens S.; Mann, Matthias; Mayer, Andreas (2002): The Vtc proteins in vacuole fusion. Coupling NSF activity to V(0) trans-complex formation. In: *The EMBO journal* 21 (3), S. 259–269. DOI: 10.1093/emboj/21.3.259.
- Munro, S.; Pelham, H. R. (1987): A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. In: *Cell* 48 (5), S. 899–907.
- Nassoury, Nasha; Cappadocia, Mario; Morse, David (2003): Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates. In: *Journal of cell science* 116 (14), S. 2867–2874. DOI: 10.1242/jcs.00517.
- Neuhaus, J. M.; Pietrzak, M.; Boller, T. (1994): Mutation analysis of the C-terminal vacuolar targeting peptide of tobacco chitinase. Low specificity of the sorting system, and gradual transition between intracellular retention and secretion into the extracellular space. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 5 (1), S. 45–54.
- Neuhaus, J. M.; Rogers, J. C. (1998): Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. In: *Plant molecular biology* 38 (1-2), S. 127–144.
- Neuhaus, Jean-Marc; Paris, Nadine (2005): Plant Vacuoles. From Biogenesis to Function. In: Jozef ?amaj, Franti?ek Balu?ka und Diedrik Menzel (Hg.): *Plant Endocytosis*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH (Plant Cell Monographs, 1), S. 63–82.
- Nickel, W.; Wieland, F. T. (1998): Biosynthetic protein transport through the early secretory pathway. In: *Histochemistry and cell biology* 109 (5-6), S. 477–486.

- Niemes, Silke; Labs, Mathias; Scheuring, David; Krueger, Falco; Langhans, Markus; Jesenofsky, Barbara et al. (2010a): Sorting of plant vacuolar proteins is initiated in the ER. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62 (4), S. 601–614. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04171.x.
- Niemes, Silke; Langhans, Markus; Viotti, Corrado; Scheuring, David; San Wan Yan, Melody; Jiang, Liwen et al. (2010b): Retromer recycles vacuolar sorting receptors from the trans-Golgi network. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 61 (1), S. 107–121. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.04034.x.
- Nishimura, Noriyuki; Balch, William E. (1997): A Di-Acidic Signal Required for Selective Export from the Endoplasmic Reticulum. In: *Science* 277 (5325), S. 556–558. DOI: 10.1126/science.277.5325.556.
- Nufer, Oliver; Guldbrandsen, Svend; Degen, Martin; Kappeler, Felix; Paccaud, Jean-Pierre; Tani, Katsuko; Hauri, Hans-Peter (2002): Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. In: *Journal of cell science* 115 (Pt 3), S. 619–628.
- Nymark, Marianne; Sharma, Amit Kumar; Sparstad, Torfinn; Bones, Atle M.; Winge, Per (2016): A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. In: *Scientific Reports* 6. DOI: 10.1038/srep24951.
- Omote, Hiroshi; Hiasa, Miki; Matsumoto, Takuya; Otsuka, Masato; Moriyama, Yoshinori (2006): The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. In: *Trends in pharmacological sciences* 27 (11), S. 587–593. DOI: 10.1016/j.tips.2006.09.001.
- Otsuka, Masato; Matsumoto, Takuya; Morimoto, Riyo; Arioka, Shigeo; Omote, Hiroshi; Moriyama, Yoshinori (2005): A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (50), S. 17923–17928. DOI: 10.1073/pnas.0506483102.
- Park, Misoon; Kim, Soo Jin; Vitale, Alessandro; Hwang, Inhwan (2004): Identification of the Protein Storage Vacuole and Protein Targeting to the Vacuole in Leaf Cells of Three Plant Species. In: *Plant physiology* 134 (2), S. 625–639. DOI: 10.1104/pp.103.030635.
- Park, Sang Yoon; Guo, Xiaoli (2014): Adaptor protein complexes and intracellular transport. In: *Bioscience reports* 34 (4). DOI: 10.1042/BSR20140069.
- Patron, Nicola J.; Waller, Ross F. (2007): Transit peptide diversity and divergence. A global analysis of plastid targeting signals. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 29 (10), S. 1048–1058. DOI: 10.1002/bies.20638.
- Pedrazzini, E.; Giovinazzo, G.; Bielli, A.; Virgilio, M. de; Frigerio, L.; Pesca, M. et al. (1997): Protein quality control along the route to the plant vacuole. In: *The Plant cell* 9 (10), S. 1869–1880. DOI: 10.1105/tpc.9.10.1869.
- Pedrazzini, Emanuela; Komarova, Nataliya Y.; Rentsch, Doris; Vitale, Alessandro (2013): Traffic routes and signals for the tonoplast. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 14 (6), S. 622–628. DOI: 10.1111/tra.12051.
- Petersen, Jörn; Ludewig, Ann-Kathrin; Michael, Victoria; Bunk, Boyke; Jarek, Michael; Baurain, Denis; Brinkmann, Henner (2014): Chromera velia, Endosymbioses and the Rhodoplex Hypothesis—Plastid Evolution in Cryptophytes, Alveolates, Stramenopiles, and Haptophytes (CASH Lineages). In: *Genome biology and evolution* 6 (3), S. 666–684. DOI: 10.1093/gbe/evu043.

- Pietra, Francesco (1997): Secondary metabolites from marine microorganisms. Bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects. In: *Natural Product Reports* 14 (5), S. 453–464. DOI: 10.1039/NP9971400453.
- Pond, Leslie; Kuhn, Leslie A.; Teyton, Luc; Schutze, Marie-Paule; Tainer, John A.; Jackson, Michael R.; Peterson, Per A. (1995): A Role for Acidic Residues in Di-leucine Motif-based Targeting to the Endocytic Pathway. In: *J. Biol. Chem.* 270 (34), S. 19989–19997. DOI: 10.1074/jbc.270.34.19989.
- Price, Dana C.; Chan, Cheong Xin; Yoon, Hwan Su; Yang, Eun Chan; Qiu, Huan; Weber, Andreas P. M. et al. (2012): Cyanophora paradoxa genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. In: *Science (New York, N.Y.)* 335 (6070), S. 843–847. DOI: 10.1126/science.1213561.
- Pryer, N. K.; Salama, N. R.; Schekman, R.; Kaiser, C. A. (1993): Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro. In: *The Journal of Cell Biology* 120 (4), S. 865–875.
- Puzik, Katharina (2016): Studien zu löslichen vakuolären Proteinen und β -Glycosidasen sowie ihrer Transportmechanismen in *Phaeodactylum tricornutum* und Lokalisationsstudien zu putativen Oilbodyproteinen in *Phaeodactylum tricornutum*. Masterarbeit. Philipps Universität Marburg, Deutschland.
- Riso, Valentina de; Raniello, Raffaella; Maumus, Florian; Rogato, Alessandra; Bowler, Chris; Falciatore, Angela (2009): Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Nucleic acids research* 37 (14), e96. DOI: 10.1093/nar/gkp448.
- Robinson, David G.; Pimpl, Peter (2014): Receptor-mediated transport of vacuolar proteins. A critical analysis and a new model. In: *Protoplasma* 251 (1), S. 247–264. DOI: 10.1007/s00709-013-0542-7.
- Rogers, Matthew B.; Gilson, Paul R.; Su, Vanessa; McFadden, Geoffrey I.; Keeling, Patrick J. (2007): The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*. Evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. In: *Molecular biology and evolution* 24 (1), S. 54–62. DOI: 10.1093/molbev/msl129.
- Rojas-Pierce, Marcela (2013): Targeting of tonoplast proteins to the vacuole. In: *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 211, S. 132–136. DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.07.005.
- Rothman, J. E.; Wieland, F. T. (1996): Protein sorting by transport vesicles. In: *Science (New York, N.Y.)* 272 (5259), S. 227–234.
- Salama, N. R.; Chuang, J. S.; Schekman, R. W. (1997): Sec31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum. In: *Molecular biology of the cell* 8 (2), S. 205–217.
- Sanchez-Puerta, M. Virginia; Delwiche, Charles F. (2008): A HYPOTHESIS FOR PLASTID EVOLUTION IN CHROMALVEOLATES. In: *Journal of Phycology* 44 (5), S. 1097–1107. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2008.00559.x.
- Sanderfoot, A. A.; Ahmed, S. U.; Marty-Mazars, D.; Rapoport, I.; Kirchhausen, T.; Marty, F.; Raikhel, N. V. (1998): A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in Arabidopsis roots. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (17), S. 9920–9925.

Sandoval, Ignacio V.; Martínez-Arca, Sonia; Valdueza, Julio; Palacios, Silvia; Holman, Geoffrey D. (2000): Distinct Reading of Different Structural Determinants Modulates the Dileucine-mediated Transport Steps of the Lysosomal Membrane Protein LIMP-II and the Insulin-sensitive Glucose Transporter GLUT4. In: *J. Biol. Chem.* 275 (51), S. 39874–39885. DOI: 10.1074/jbc.M006261200.

Satiat-Jeunemaitre, Beatrice; Hawes, Chris (1993): Insights into the secretory pathway and vesicular transport in plant cells. In: *Biology of the Cell* 79 (1), S. 7–15. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/024849009390257F/pdf?md5=4d77ff84f17933acc8420778980f86f8&pid=1-s2.0-024849009390257F-main.pdf>.

Sato, Ken; Nakano, Akihiko (2002): Emp47p and its close homolog Emp46p have a tyrosine-containing endoplasmic reticulum exit signal and function in glycoprotein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular biology of the cell* 13 (7), S. 2518–2532. DOI: 10.1091/mbc.E02-01-0027.

Schaffner, W.; Weissmann, C. (1973): A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. In: *Analytical Biochemistry* 56 (2), S. 502–514. DOI: 10.1016/0003-2697(73)90217-0.

Schneider, Sabine; Beyhl, Diana; Hedrich, Rainer; Sauer, Norbert (2008): Functional and physiological characterization of Arabidopsis INOSITOL TRANSPORTER1, a novel tonoplast-localized transporter for myo-inositol. In: *The Plant cell* 20 (4), S. 1073–1087. DOI: 10.1105/tpc.107.055632.

Schreiber, Viktoria; Dersch, Josefine; Puzik, Katharina; Backer, Oliver; Liu, Xiaojuan; Stork, Simone et al. (2017): The Central Vacuole of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Identification of New Vacuolar Membrane Proteins and of a Functional Di-leucine-based Targeting Motif. In: *Protist* 168 (3), S. 271–282. DOI: 10.1016/j.protis.2017.03.001.

Serafini, T.; Orci, L.; Amherdt, M.; Brunner, M.; Kahn, R. A.; Rothman, J. E. (1991): ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles. A novel role for a GTP-binding protein. In: *Cell* 67 (2), S. 239–253.

Shen, Jinbo; Ding, Yu; Gao, Caiji; Rojo, Enrique; Jiang, Liwen (2014): N-linked glycosylation of AtVSR1 is important for vacuolar protein sorting in Arabidopsis. In: *The Plant Journal* 80 (6), S. 977–992. DOI: 10.1111/tpj.12696.

Shen, Jinbo; Suen, Pui Kit; Wang, Xiangfeng; Lin, Youshun; Lo, Sze Wan; Rojo, Enrique; Jiang, Liwen (2013): An in vivo expression system for the identification of cargo proteins of vacuolar sorting receptors in Arabidopsis culture cells. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 75 (6), S. 1003–1017. DOI: 10.1111/tpj.12257.

Slavikova, Silvia; Vacula, Rostislav; Fang, Zhiwei; Ehara, Tomoko; Osafune, Tetsuaki; Schwartzbach, Steven D. (2005): Homologous and heterologous reconstitution of Golgi to chloroplast transport and protein import into the complex chloroplasts of *Euglena*. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 8), S. 1651–1661. DOI: 10.1242/jcs.02277.

Song, Jinhee; Lee, Myoung Hui; Lee, Gil-Je; Yoo, Cheol Min; Hwang, Inhwan (2006): Arabidopsis EPSIN1 plays an important role in vacuolar trafficking of soluble cargo proteins in plant cells via interactions with clathrin, AP-1, VTI11, and VSR1. In: *The Plant cell* 18 (9), S. 2258–2274. DOI: 10.1105/tpc.105.039123.

- Stefano, Giovanni; Renna, Luciana; Chatre, Laurent; Hanton, Sally L.; Moreau, Patrick; Hawes, Chris; Brandizzi, Federica (2006): In tobacco leaf epidermal cells, the integrity of protein export from the endoplasmic reticulum and of ER export sites depends on active COPI machinery. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46 (1), S. 95–110. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02675.x.
- Stenmark, Harald (2009): Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (8), S. 513–525. DOI: 10.1038/nrm2728.
- Stockklausner, C.; Ludwig, J.; Ruppertsberg, J. P.; Klocker, N. (2001): A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels. In: *FEBS letters* 493 (2-3), S. 129–133.
- Stoebe, Bettina; Maier, Uwe-G. (2002): One, two, three. Nature's tool box for building plastids. In: *Protoplasma* 219 (3), S. 123–130. DOI: 10.1007/s007090200013.
- Tanchak, M. A.; Rennie, P. J.; Fowke, L. C. (1988): Ultrastructure of the partially coated reticulum and dictyosomes during endocytosis by soybean protoplasts. In: *Planta* 175 (4), S. 433–441. DOI: 10.1007/BF00393062.
- Tanigawa, G.; Orci, L.; Amherdt, M.; Ravazzola, M.; Helms, J. B.; Rothman, J. E. (1993): Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. In: *The Journal of Cell Biology* 123 (6 Pt 1), S. 1365–1371.
- Timmis, Jeremy N.; Ayliffe, Michael A.; Huang, Chun Y.; Martin, William (2004): Endosymbiotic gene transfer. Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. In: *Nature reviews. Genetics* 5 (2), S. 123–135. DOI: 10.1038/nrg1271.
- Tonkin, Christopher J.; Kalanon, Ming; McFadden, Geoffrey I. (2008): Protein targeting to the malaria parasite plastid. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9 (2), S. 166–175. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00660.x.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. In: *PNAS* 76 (9), S. 4350–4354. Online verfügbar unter <http://www.pnas.org/content/76/9/4350.full.pdf>.
- Trentmann, Oliver; Haferkamp, Ilka (2013): Current progress in tonoplast proteomics reveals insights into the function of the large central vacuole. In: *Frontiers in plant science* 4, S. 34. DOI: 10.3389/fpls.2013.00034.
- Tse, Yu Chung; Mo, Beixin; Hillmer, Stefan; Zhao, Min; Lo, Sze Wan; Robinson, David G.; Jiang, Liwen (2004): Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. In: *The Plant cell* 16 (3), S. 672–693. DOI: 10.1105/tpc.019703.
- Tsirigos, Konstantinos D.; Peters, Christoph; Shu, Nanjiang; Käll, Lukas; Elofsson, Arne (2015): The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. In: *Nucleic acids research* 43 (W1), W401–7. DOI: 10.1093/nar/gkv485.
- Uemura, Tomohiro; Morita, Miyo Terao; Ebine, Kazuo; Okatani, Yusuke; Yano, Daisuke; Saito, Chieko et al. (2010): Vacuolar/pre-vacuolar compartment Qa-SNAREs VAM3/SYP22 and PEP12/SYP21 have interchangeable functions in Arabidopsis. In: *The Plant Journal* 64 (5), S. 864–873. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04372.x.

- Ungewickell, E.; Branton, D. (1981): Assembly units of clathrin coats. In: *Nature* 289 (5796), S. 420–422.
- van Roey, Kim; Uyar, Bora; Weatheritt, Robert J.; Dinkel, Holger; Seiler, Markus; Budd, Aidan et al. (2014): Short linear motifs. Ubiquitous and functionally diverse protein interaction modules directing cell regulation. In: *Chemical reviews* 114 (13), S. 6733–6778. DOI: 10.1021/cr400585q.
- Vitale; Denecke (1999): The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. In: *The Plant cell* 11 (4), S. 615–628.
- Vitale, Alessandro; Hinz, Gisbert (2005): Sorting of proteins to storage vacuoles. How many mechanisms? In: *Trends in plant science* 10 (7), S. 316–323. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.05.001.
- Wang, Junqi; Cai, Yi; Miao, Yansong; Lam, Sheung Kwan; Jiang, Liwen (2009): Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments. In: *J Exp Bot* 60 (11), S. 3075–3083. DOI: 10.1093/jxb/erp136.
- Wang, Xiangfeng; Cai, Yi; Wang, Hao; Zeng, Yonglun; Zhuang, Xiaohong; Li, Baiying; Jiang, Liwen (2014): Trans-Golgi network-located AP1 gamma adaptins mediate dileucine motif-directed vacuolar targeting in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 26 (10), S. 4102–4118. DOI: 10.1105/tpc.114.129759.
- Watanabe, Etsuko; Shimada, Tomoo; Kuroyanagi, Miwa; Nishimura, Mikio; Hara-Nishimura, Ikuko (2002): Calcium-mediated association of a putative vacuolar sorting receptor PV72 with a propeptide of 2S albumin. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (10), S. 8708–8715. DOI: 10.1074/jbc.M109346200.
- Watanabe, Etsuko; Shimada, Tomoo; Tamura, Kentaro; Matsushima, Ryo; Koumoto, Yasuko; Nishimura, Mikio; Hara-Nishimura, Ikuko (2004): An ER-localized form of PV72, a seed-specific vacuolar sorting receptor, interferes the transport of an NPIR-containing proteinase in Arabidopsis leaves. In: *Plant & cell physiology* 45 (1), S. 9–17.
- Waters, M. G.; Serafini, T.; Rothman, J. E. (1991): 'Coatomer'. A cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. In: *Nature* 349 (6306), S. 248–251. DOI: 10.1038/349248a0.
- Williams, M. A.; Fukuda, M. (1990): Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. In: *The Journal of Cell Biology* 111 (3), S. 955–966.
- Woehle, Christian; Dagan, Tal; Martin, William F.; Gould, Sven B. (2011): Red and Problematic Green Phylogenetic Signals among Thousands of Nuclear Genes from the Photosynthetic and Apicomplexa-Related Chromera velia. In: *Genome Biol Evol* 3, S. 1220–1230. DOI: 10.1093/gbe/evr100.
- Wolfenstetter, Susanne; Wirsching, Petra; Dotzauer, Dorina; Schneider, Sabine; Sauer, Norbert (2012): Routes to the tonoplast. The sorting of tonoplast transporters in Arabidopsis mesophyll protoplasts. In: *The Plant cell* 24 (1), S. 215–232. DOI: 10.1105/tpc.111.090415.
- Wormit, Alexandra; Traub, Michaela; Florchinger, Martin; Neuhaus, H. Ekkehard; Mohlmann, Torsten (2004): Characterization of three novel members of the Arabidopsis thaliana equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. In: *The Biochemical journal* 383 (Pt 1), S. 19–26. DOI: 10.1042/BJ20040389.

- Xiang, Li; Etcheberria, Ed; van den Ende, Wim (2013): Vacuolar protein sorting mechanisms in plants. In: *The FEBS journal* 280 (4), S. 979–993. DOI: 10.1111/febs.12092.
- Yagisawa, Fumi; Nishida, Keiji; Yoshida, Masaki; Ohnuma, Mio; Shimada, Takashi; Fujiwara, Takayuki et al. (2009): Identification of novel proteins in isolated polyphosphate vacuoles in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 60 (5), S. 882–893. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2009.04008.x.
- Yamada, Kohji; Osakabe, Yuriko; Mizoi, Junya; Nakashima, Kazuo; Fujita, Yasunari; Shinozaki, Kazuo; Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko (2010): Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (2), S. 1138–1146. DOI: 10.1074/jbc.M109.054288.
- Yan, Nieng (2015): Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. In: *Annual review of biophysics* 44, S. 257–283. DOI: 10.1146/annurev-biophys-060414-033901.
- Yoon, Hwan Su; Hackett, Jeremiah D.; Pinto, Gabriele; Bhattacharya, Debashish (2002): The single, ancient origin of chromist plastids. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24), S. 15507–15512. DOI: 10.1073/pnas.242379899.
- Zachert, Anna-Lena (2017): Identifikation und Lokalisation von putativen Two pore Kaliumkanälen, der Adaptorproteinkomplex Untereinheit σ und den β -Glykosidasen in *Phaeodactylum tricornutum*. Bachelorarbeit. Philipps Universität Marburg, Deutschland. Zellbiologie 1.
- Zaslavskaja, Lioudmila A.; Lippmeier, J. Casey; Kroth, Peter G.; Grossman, Arthur R.; Apt, Kirk E. (2000): Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. In: *Journal of Phycology* 36 (2), S. 379–386. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2000.99164.x.
- Zhang, Haiwen; Zhao, Fu-Geng; Tang, Ren-Jie; Yu, Yuexuan; Song, Jiali; Wang, Yuan et al. (2017): Two tonoplast MATE proteins function as turgor-regulating chloride channels in *Arabidopsis*. In: *PNAS* 114 (10), E2036–E2045. DOI: 10.1073/pnas.1616203114.
- Zwiewka, Marta; Feraru, Elena; Möller, Barbara; Hwang, Inhwan; Feraru, Mugurel I.; Kleine-Vehn, Jürgen et al. (2011): The AP-3 adaptor complex is required for vacuolar function in *Arabidopsis*. In: *Cell Research* 21 (12), S. 1711. DOI: 10.1038/cr.2011.99.

7 Anhang

7.1 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der *in silico* Ansätze zur Identifizierung vakuolärer Proteine in *P. tricornutum*

Die folgenden aufgeführten Proteine wurden über einen gerichteten Ansatz (s. Kap. 5.2.25) über BLASTp in der *P. tricornutum*-Genomdatenbank identifiziert.

Tabelle 29: Zusammenfassung des gerichteten *in silico* Ansatzes zu Identifizierung von vakuolären Proteinen in *P. tricornutum*. Aufgelistet wurden die Annotierungen aus der Genomdatenbank von *A. thaliana* (www.arabidopsis.org), sowie die Proteinnamen der *A. thaliana*-Proteine, und konservierte Proteindomänen. Die Protein IDs stammen aus der Genomdatenbank von *P. tricornutum* (www.jgi.doe.gov) sowie aus der Genomdatenbank von *A. thaliana*.

Description from TAIR database	other name from TAIR	<i>A. thaliana</i> TAIR-locus	<i>P. tricornutum</i> Protein ID	Domain
tonoplast intrinsic protein 4;1	TIP4;1;	AT2G25810	43157	MIP/TIP
Delta tonoplast intrinsic protein	AQP1; ATTIP2;1; DELTA tonoplast INTEGRAL PROTEIN; DELTA-TIP; DELTA-TIP1; TIP2;1	AT3G16240	bd1692	MIP/TIP
gamma tonoplast intrinsic protein 2 (TIP2)	GAMMA-TIP2; SALT-STRESS INDUCIBLE tonoplast INTRINSIC PROTEIN; SITIP; TIP1;2; TIP2; tonoplast INTRINSIC PROTEIN 2	AT3G26520	44871	MIP/TIP
tonoplast intrinsic protein 2;2 (TIP2;2)	DELTA-TIP2; TIP2;2; tonoplast INTRINSIC PROTEIN 2;2	AT4G17340	20755	MIP/TIP
gamma tonoplast intrinsic protein 1 (TIP1)	GAMMA tonoplast INTRINSIC PROTEIN; GAMMA tonoplast INTRINSIC PROTEIN 1; GAMMA-TIP; GAMMA-TIP1; TIP1;1; tonoplast INTRINSIC PROTEIN 1;1	AT2G36830	42538	MIP/TIP
Encodes ESL1, a transporter for monosaccharides	ERD (EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION) SIX-LIKE 1; ESL1	AT1G08920	9947; 47769; 12520; 23260; 2164; 30620; 11826; 27361; 18469; 45672; 46251	Major Facilitator Superfamily (MFS)
Encodes a vacuolar glucose exporter	AtERDL6	AT1G75220	9947; 47769; 12520; 23260; 2164; 30620; 11826; 27361; 18469; 45672; 46251	Major Facilitator Superfamily (MFS)
tonoplast monosaccharide transporter1 (TMT1)	AtTMT1	AT1G20840	9947; 47769; 12520; 23260; 2164; 30620; 11826; 27361; 18469; 45672; 46251	Major Facilitator Superfamily (MFS)

tonoplast monosaccharide transporter2 (TMT2)	AtTMT2	AT4G35300	9947; 47769; 12520; 23260; 2164; 30620; 11826; 27361; 18469; 45672; 46251	Major Facilitator Superfamily (MFS)
tonoplast monosaccharide transporter3 (TMT3)	AtTMT3	AT3G51490	9947; 47769; 12520; 23260; 2164; 30620; 11826; 27361; 18469; 45672; 46251	Major Facilitator Superfamily (MFS)
vacuolar membrane-localized glucose transporter	AtVGT1	AT3G03090	9947; 47769; 12520; 23260; 2164; 30620; 11826; 27361; 18469; 45672; 46251	Major Facilitator Superfamily (MFS)
vacuolar membrane-localized glucose transporter	AtVGT2	AT5G17010	9947; 47769; 12520; 23260; 2164; 30620; 11826; 27361; 18469; 45672; 46251	Major Facilitator Superfamily (MFS)
Major facilitator superfamily protein	MFS	AT2G48020	9947; 47769; 12520; 23260; 2164; 30620; 11826; 27361; 18469; 45672; 46251	Major Facilitator Superfamily (MFS)
Major facilitator superfamily protein	MFS	AT1G19450	9947; 47769; 12520; 23260; 2164; 30620; 11826; 27361; 18469; 45672; 46251	Major Facilitator Superfamily (MFS)
Encodes ATNRT2.7, a nitrate transporter that controls nitrate content in seeds. Expression is detected in reproductive organs and peaks in seeds. Localized to the vacuolar membrane.	AtNRT2.7;	AT5G14570	26029; 2032; 54101; 54560; 2171	Major Facilitator Superfamily (MFS)
Encodes ZIF1 (ZINC-INDUCED FACILITATOR1), a member of the Major Facilitator Superfamily (MFS) of membrane proteins which are found in all organisms and transport a wide range of small, organic molecules. Involved in a mechanism of Zn sequestration, possibly by transport of a Zn ligand or Zn-ligand complex into vacuoles.	AtZIF1	AT5G13740	33116	Major Facilitator Superfamily (MFS)
zinc induced facilitator-like 1 (ZIFL1)	AtZIFL1	AT5G13750	33116	Major Facilitator Superfamily (MFS)
Encodes a vacuole localized protein of the ABC transporter White-Brown Complex (WBC) family. When overexpressed in planta, confers resistance to kanamycin.	ABCG19 ATP-BINDING CASSETTE G19 ATWBC19 WBC19 WHITE-BROWN COMPLEX HOMOLOG 19	AT3G55130	49726; 14778; 25218; 34685	ABC2_membrane; ABC-2 type transporter
member of MRP subfamily	ABCC8; ARABIDOPSIS THALIANA MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 6;	AT3G21250	20872; 18826; 20026; 11674; 18197; 9180; 43299; 10151	ABC ATPase superfamily MRP Domain
member of MRP subfamily	ABCC8; ARABIDOPSIS THALIANA MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 6;	AT3G21250	20872; 18826; 20026; 11674; 18197; 9180; 43299; 10151	ABC ATPase superfamily MRP Domain

encodes a high-affinity inositol hexakisphosphate transporter that plays a role in guard cell signaling and phytate storage. It is a member of MRP subfamily / ABC transporter subfamily C.	ABCC5; ARABIDOPSIS THALIANA ATP-BINDING CASSETTE C5; ATABCC5; ATMRP5; ATP-BINDING CASSETTE C5; MRP5;	AT1G04120	18197; 9180; 43299; 10151	ABC ATPase superfamily MRP Domain
Encodes a member of TAP subfamily of ABC transporters that is located in the vacuole. Mutants are hypersensitive to aluminum and the gene product may be important for intracellular movement of some substrate, possibly chelated Al, as part of a mechanism of aluminum sequestration.	ABCB27; ALS1; ALUMINUM SENSITIVE 1; ARABIDOPSIS THALIANA TRANSPORTER ASSOCIATED WITH ANTIGEN PROCESSING PROTEIN 2; ATALS1; ATP-BINDING CASSETTE B27; ATTAP2; TAP2;	AT5G39040	18197; 9180; 43299; 10151	ABC ATPase superfamily MRP Domain
member of MRP subfamily	ABCC14; ATMRP10; ATP-BINDING CASSETTE C14; MRP10; MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 10	AT3G62700	18197; 9180; 43299; 10151	ABC ATPase superfamily MRP Domain
encodes an ATP-dependent MRP-like ABC transporter able to transport glutathione-conjugates as well as chlorophyll catabolites. The expression of this gene is upregulated by herbicide safeners such as benoxacor and fenclorim.	ABCC3; ATMRP3; ATP-BINDING CASSETTE C3; MRP3; MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN 3;	AT3G13080	18197; 9180; 43299; 10151	ABC ATPase superfamily MRP Domain
glutathione S-conjugate transporting ATPase (AtMRP1) mRNA. An ABCC-type arsenite-phytochelatin transporter. The expression of this gene is upregulated by herbicide safeners such as benoxacor and fenclorim.	ABCC1; ARABIDOPSIS THALIANA ATP-BINDING CASSETTE C1; ARABIDOPSIS THALIANA MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 1; ATABCC1; ATMRP1; ATP-BINDING CASSETTE C1; EST1; MRP1; MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 1	AT1G30400	18197; 9180; 43299; 10151	ABC ATPase superfamily MRP Domain
encodes a multidrug resistance-associated protein that is MgATP-energized glutathione S-conjugate pump. An ABCC-type arsenite-phytochelatin transporter. The expression of this gene is upregulated by herbicide safeners such as benoxacor and fenclorim.	ABCC2; ARABIDOPSIS THALIANA ATP-BINDING CASSETTE C2; ATABCC2; ATMRP2; ATP-BINDING CASSETTE C2; EST4; MRP2; MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 2	AT2G34660	18197; 9180; 43299; 10151	ABC ATPase superfamily MRP Domain
Encodes a member of the zinc transporter (ZAT) and cation diffusion facilitator (CDF) families. It is expressed throughout the plant, especially in dividing, differentiating and expanding cells. The protein is localized to the vacuolar membrane. Mediates Zn ion homeostasis.	A. THALIANA CATION DIFFUSION FACILITATOR 1; ATCDF1; ATMTTP1; METAL TOLERANCE PROTEIN 1; MTP1; ZAT; ZAT1	AT2G46800	23557	CzcD; Co/Zn/Cd efflux system component
Member of Zinc transporter (ZAT) family. Contributes to basic cellular Zn tolerance and controls Zn partitioning, particularly under conditions of high rates of Zn influx into the root symplasm. Localizes to the vacuolar membrane.	ARABIDOPSIS METAL TOLERANCE PROTEIN 3; ATMTTP3; ATMTTPA2; METAL TOLERANCE PROTEIN 3; METAL TOLERANCE PROTEIN A2; MTP3; MTPA2	AT3G58810	23557	Ca_efflux_superfamily

Encodes a proton antiporter. Involved in the transportation of proanthocyanidin precursors into the vacuole.	A. THALIANA TRANSPARENT TESTA; ATTT12;	AT3G59030	48159; 35296	multidrug and toxic compound extrusion (MATE)
MATE efflux family protein; LOCATED IN: plasma membrane, vacuole, membrane		AT3G26590	48159; 47346; 43134	multidrug and toxic compound extrusion (MATE)
Encodes glutathione transferase belonging to the phi class of GSTs. Naming convention according to Wagner et al. (2002). Mutants display no pigments on leaves and stems. Likely to function as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts.	ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 12; ATGSTF12	AT5G17220	6848	GST-C-superfamily
Encodes FPN2, a tonoplast localized nickel transport protein. FPN2 is one of the Arabidopsis orthologs (AT2G38460/IREG1/FPN1 and AT5G03570/IREG2/FPN2) the iron efflux transporter ferroportin (FPN) identified in animals.	ARABIDOPSIS THALIANA IRON-REGULATED PROTEIN 2; ATIREG2; FERROPORTIN 2; FPN2	AT5G03570	54495	FPN1
Encodes a H(+)-translocating (pyrophosphate-energized) inorganic pyrophosphatase (H(+)-PPase; EC 3.6.1.1) located in the vacuolar membrane.	ARABIDOPSIS THALIANA V-PPASE 3; ATAVP1; ATAVP3; ATVHP1;1; AVP-3;	AT1G15690	21183; 15815; 26190	H-Ppase
Encodes a high affinity vacuolar calcium antiporter. The residue His 338 is critical to Ca ²⁺ transport activity. Disruption of CAX1 reduces manganese and zinc of shoot tissue and results in a decrease in the activity of vacuolar V-type proton ATPase.	ATCAX1; CATION EXCHANGER 1; CAX1	AT2G38170	11387; 2762	caca2
low affinity calcium antiporter CAX2	ATCAX2; CATION EXCHANGER 2; CAX2	AT3G13320	11387; 2762	caca2
cation exchanger 3 (CAX3)	ATCAX3; ATHCX1; CATION EXCHANGER 3; CAX1-LIKE; CAX3	AT3G51860	11387; 2762	caca2
Encodes a cation/proton antiporter, a member of low affinity calcium antiporter CAX2 family.	ATCAX4; CATION EXCHANGER 4; CAX4	AT5G01490	11387; 2762	caca2
Encodes a depolarization-activated Ca(2+) channel.	ATCCH1; ATTPC1; CALCIUM CHANNEL 1	AT4G03560	15329	lon_trans
member of Anion channel protein family	ATCLC-B; CHLORIDE CHANNEL B; CLC-B	AT3G27170	52412; 28245; 46097	voltage gated_CiC superfamily
member of Anion channel protein family	ATCLC-C; CHLORIDE CHANNEL C; CLC-C	AT5G49890	52412; 28245; 46097	voltage gated_CiC superfamily
Encodes a tonoplast-localized myo-inositol exporter, involved in efflux of myo-inositol from the vacuole to the cytosol. The gene is ubiquitously expressed. Reduced root growth in knock-out mutants grown on low inositol agar medium.	ATINT1; INOSITOL TRANSPORTER 1; INT1	AT2G43330	27361; 23260; 9947	MFS

Encodes AtTPK1 (KCO1), a member of the Arabidopsis thaliana K ⁺ channel family of AtTPK/KCO proteins. AtTPK1 is targeted to the vacuolar membrane. Forms homomeric ion channels in vivo. Voltage-independent and Ca ²⁺ -activated K ⁺ channel. Activated by 14-3-3 proteins.	ATKCO1; ATTPK1; CA2+ ACTIVATED OUTWARD RECTIFYING K ⁺ CHANNEL 1; KCO1	AT5G55630	3676; 43530; 43171; 38821; 46302	lon_trans_2
Encodes AtTPK2 (KCO2), a member of the Arabidopsis thaliana K ⁺ channel family of AtTPK/KCO proteins. AtTPK2 is targeted to the vacuolar membrane. May form homomeric ion channels in vivo.	ATKCO2; ATTPK2; CA2+ ACTIVATED OUTWARD RECTIFYING K ⁺ CHANNEL 2; KCO2	AT5G46370	3676; 43530; 43171; 38821; 46302	lon_trans_2
Encodes AtKCO3, a member of the Arabidopsis thaliana K ⁺ channel family of AtTPK/KCO proteins. AtKCO3 is targeted to the vacuolar membrane. Forms homomeric ion channels in vivo.	ATKCO3; CA2+ ACTIVATED OUTWARD RECTIFYING K ⁺ CHANNEL 3; KCO3	AT5G46360	3676; 43530; 43171; 38821; 46302	lon_trans_2
Encodes AtTPK5, a member of the Arabidopsis thaliana K ⁺ channel family of AtTPK/KCO proteins. AtTPK5 is targeted to the vacuolar membrane. May form homomeric ion channels in vivo.	ATKCO5; ATTPK5; CA2+ ACTIVATED OUTWARD RECTIFYING K ⁺ CHANNEL 5; KCO5	AT4G01840	3676; 43530; 43171; 38821; 46302	lon_trans_2
Encodes AtTPK3 (KCO6), a member of the Arabidopsis thaliana K ⁺ channel family of AtTPK/KCO proteins. AtTPK3 is targeted to the vacuolar membrane. May form homomeric ion channels in vivo.	ATKCO6; ATTPK3; CA2+ ACTIVATED OUTWARD RECTIFYING K ⁺ CHANNEL 6; KCO6; TPK3	AT4G18160	3676; 43530; 43171; 38821; 46302	lon_trans_2
Encodes a vacuolar sodium/proton antiporter involved in salt tolerance, ion homeostasis, and leaf development.	AT-NHX1; ATNHX; ATNHX1; NA ⁺ /H ⁺ EXCHANGER 1; NHX1	AT5G27150	22353; 14403; 1764; bd1750	CPA1
Encodes an iron transporter required for iron sequestration into vacuoles. Expressed in developing embryo and seed. Localized in the vacuolar membrane.	ATVIT1; VACUOLAR IRON TRANSPORTER 1; VIT1	AT2G01770	26157; 37632; 43314; 43313	CCC1
Encodes a member of the cationic amino acid transporter (CAT) subfamily of amino acid polyamine choline transporters. Localized to the tonoplast.	CAT2; CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER 2	AT1G58030	15324	AA-permease
Endomembrane protein 70 protein family; LOCATED IN: integral to membrane, Golgi apparatus, plasma membrane, vacuole		AT4G12650	47670; 25752; 42002; 22145; 12587; 13662; 26299	EMP70; Endomembrane protein 70;
Major facilitator superfamily protein; LOCATED IN: plasma membrane, vacuole		AT5G14120	47069	Nodulin like
Major Facilitator Superfamily with SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein; INVOLVED IN: transmembrane transport; LOCATED IN: vacuolar membrane, plant-type vacuole.		AT1G63010	19586; 20899	SPX-superfamily
Cytosol aminopeptidase family protein; FUNCTIONS IN: manganese ion binding, metalloexopeptidase activity, aminopeptidase activity; INVOLVED IN: response to cadmium ion, proteolysis; LOCATED IN: vacuole	LAP1; LEUCYL AMINOPEPTIDASE 1	AT2G24200	1884	Peptidase M17
Encodes a vacuolar processing enzyme belonging to a novel group of cysteine proteases that is expressed specifically in seeds and is essential for the proper processing of storage proteins.	BETA VACUOLAR PROCESSING ENZYME;	AT1G62710	30638	Peptidase_C13
Zn-dependent exopeptidases superfamily protein		AT5G60160	20708; 27719	Peptidase_M18

Serine carboxypeptidase S28 family protein		AT4G36195	50463; 47060; 49316	Peptidase_S28
Senescence-associated gene 12 (SAG12) encoding a cysteine protease influenced by cytokinin, auxin, and sugars. Localized to special vacuole found during senescence called senescence associated vacuoles which are different from central vacuole in the tonoplast composition and pH.	SAG12; SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 12	AT5G45890	25434; 50322; 20066	peptidase C1A and inhibitor I29 others
tracheary element vacuolar protein	XCP1; XYLEM CYSTEINE PEPTIDASE 1	AT4G35350	25433; 50321	peptidase C1A and inhibitor I29 others
Calmodulin like protein localized in the plant vacuolar compartment with a function of binding and modifying the activity of a tonoplast transporter (AtNHX1) from within the vacuole in a Ca ²⁺ - and pH-dependent manner		AT3G03000	23794; 40998	peptidase C1A and inhibitor I29 others
	AUTOINHIBITED CA(2+)-ATPASE, ISOFORM 4; ACA4	AT2G41560	44474; 54778; 47620	ATPase_IIB_Ca2
Encodes a calmodulin-regulated Ca(2+)-ATPase	ACA11; AUTOINHIBITED CA2+-ATPASE 11	AT3G57330	44474; 54778; 47620	ATPase_IIB_Ca2
Glycosyl hydrolase family 38 protein		AT3G26720	52108	PLN02701
Glycosyl hydrolase family 38 protein		AT5G13980	52108	PLN02701
Glycosyl hydrolase family protein		AT5G10560	35668; 49793; 26742	PLN03080
Involved in vesicle trafficking between the trans -Golgi network and vacuoles.	ZIG SUPPRESSOR 4; ZIP4	AT1G56590	18241; 54375; 45284; 18142	AP-3_Mu3_Cterm:
Homologous to yeast VPS11. Forms a complex with VCL1 and AtVPS33. Involved in vacuolar biogenesis.	ATVPS11; VACUOLAR PROTEIN SORTING 11; VPS11	AT2G05170	43038	
Clathrin, heavy chain		AT3G11130	54801	Clathrin
Encodes a protein that has been shown to specifically interact with a sequence motif, PIEPPPHH, in the cytoplasmic tail of a membrane protein that directs the protein from the ER to vacuoles where it is internalized.	AE7; AS1/2 ENHANCER7	AT1G68310	11954	DUF59
Encodes APG8, a component of autophagy conjugation pathway. Delivered to the lumens of vacuole under nitrogen-starvation condition.	APG8H ATG8I AUTOPHAGY 8H	AT3G15580	50303	GABARAP;
Encodes a member of Synaptobrevin -like protein family. VAMP727 is a R-SNARE and interacts with SYP22/VTI11/SYP51.	ATVAMP727; VAMP727; VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 727	AT3G54300	17683; 45601; 48591	Longin / synaptobrevin
Encodes VAP27 (for Vesicle-Associated Protein).	(AT)VAP; VAMP/SYNAPOBREVIN-ASSOCIATED PROTEIN 27-1;	AT3G60600	48918	MSP
vacuolar SORTING RECEPTOR 2 (VSR2);	ATVSR2; BINDING PROTEIN OF 80 KDA 1;2; BP80-1;2;	AT2G30290	48084; 42953; 46131	PA-superfamily

vacuolAR SORTING RECEPTOR 5 (VSR5);	BINDING PROTEIN OF 80 KDA 3;2; BP80-3;2;	AT2G34940	48084; 42953; 46131	PA-superfamily
Encodes the vacuolar Sorting Receptor-1 (VSR-1)	BINDING PROTEIN OF 80 KDA 1;1;	AT3G52850	48084; 42953; 46131	PA-superfamily
vacuolAR SORTING RECEPTOR 7 (VSR7);	BINDING PROTEIN OF 80 KDA 3;1; BP80-3;1;	AT4G20110	48084; 42953; 46131	PA-superfamily
vacuolAR SORTING RECEPTOR 6 (VSR6);	BINDING PROTEIN OF 80 KDA 3;3; BP80-3;3;	AT1G30900	48084; 42953; 46131	PA-superfamily
encodes a vacuolar sorting receptor	BINDING PROTEIN OF 80 KDA 2;1; BP80-2;1;	AT2G14720	48084; 42953; 46131	PA-superfamily
Encodes a vacuolar sorting receptor that participates in vacuolar sorting in vegetative tissues and in seeds.	ATVSR3; BINDING PROTEIN OF 80 KDA 2;2;	AT2G14740	48084; 42953; 46131	PA-superfamily
involved in trafficking from the trans-Golgi Network to the central vacuole.	ADL6; DRP2A; DYNAMIN-LIKE PROTEIN 6; DYNAMIN-RELATED PROTEIN 2A	AT1G10290	54751	RAS-like GTPase superfamily
A peripheral membrane protein that associates with microsomal membranes, likely to function in the transport of proteins to the vacuole. It is a member of Sec1p protein family. It may be involved in the regulation of vesicle fusion reactions through interaction with t-SNAREs at the Golgi trans face.	ATVPS45; VACUOLAR PROTEIN SORTING 45; VPS45	AT1G77140	36720; 43202; 11956	sec1
Homologous to yeast VPS33. Forms a complex with VCL1 and AtVPS11. Involved in vacuolar biogenesis.	ATVPS33; VACUOLAR PROTEIN SORTING 33; VPS33	AT3G54860	42975	sec1
necessary for proper vacuole formation and morphogenesis in Arabidopsis	EMB258; MAN; MANGLED; VACUOLELESS 1; VCL1	AT2G38020	47275	VPS16
Encodes a member of SYP4 Gene Family that is a plant ortholog of the Tlg2/syntaxin16 Qa-SNARE.	ATSYP42; ATTLG2B; SYNTAXIN OF PLANTS 42; SYP42; TLG2B	AT4G02195	13459	Syntaxin / t-snare
member of VTI1 Gene Family. Normally localizes to the transgolgi network and plasma membrane.	ATVTI12; VESICAL TRANSPORT V-SNARE 12; VTI12; VTI1B	AT1G26670	40521; 43244; 49105	V-snare
Encodes a member of SNARE gene family. Homologous with yeast VTI1 and is involved in vesicle transport.	ATVTI11; ATVTI1A; VESICLE TRANSPORT V-SNARE 11; VTI11; VTI1A;	AT5G39510	40521	V-snare
Might be involved in protein sorting to the vacuole.	ATVAM2; ATVPS41; VACUOLAR PROTEIN SORTING 41; VAM2; VPS41; ZIGZAG SUPPRESSOR 2; ZIP2	AT1G08190	45316	WD40; CLH
encodes a novel protein that may be part of a gene family represented by bovine phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 (PA-PLA1)containing a putative transmembrane domain. SGR2 is involved in the formation and function of the vacuole.	SGR2	AT1G31480	44005; 44066	DDHD
Encodes a sphingosine kinase,	SPHINGOSINE KINASE 1; SPHK1	AT4G21540	44806	DAGK_cat

SOUL heme-binding family protein; FUNCTIONS IN: binding; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: plasma membrane, vacuole	ATHBP1; HBP1	AT1G17100	bd1699; 37136; 49656	SOUL; heme-binding protein
HYPERSENSITIVE-INDUCED RESPONSE PROTEIN 1 (HIR1); INVOLVED IN: N-terminal protein myristoylation; LOCATED IN: plasma membrane, vacuole, membrane;	ATHIR1;	AT5G62740	19805; 11673; 37859	BAND_7_4
SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family; INVOLVED IN: N-terminal protein myristoylation; LOCATED IN: mitochondrion, plasma membrane, vacuole, membrane;	ATHIR2;	AT3G01290	19805; 11673; 37859	BAND_7_4
SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family;		AT1G69840	19805; 11673; 37859	BAND_7_4
SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family		AT5G51570	19805; 11673; 37859	BAND_7_4
FUNCTIONS IN: oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors; INVOLVED IN: lipid metabolic process; LOCATED IN: plasma membrane, vacuole		AT1G73650	33955; 45361; 48600	DUF1295
catalytics; FUNCTIONS IN: catalytic activity; LOCATED IN: endoplasmic reticulum, plasma membrane, vacuole;		AT5G11560	43900	DUF1620
early-responsive to dehydration 4 (ERD4);	ERD4	AT1G30360	39402; 1473; 43772	DUF221
xylose isomerase family protein;		AT5G57655	30786	XylA; xylose isomerase
Saccharopine dehydrogenase		AT5G39410	32292; 41409	
Zn-dependent exopeptidases superfamily protein		AT3G52640	43532	

7.2 *In silico* Analysen der potentiellen Glykosidasen

Tabelle 30: Zusammenfassung der *in silico* Analysen hinsichtlich der Transmembrandomänen mittels verschiedener Vorhersagetoools

Tool	βGlyc1 (49793)	βGlyc2 (26742)	βGlyc3 (35668)	βGlyc4 (50351)	Peptidase (50463)
DAS-TMfilter	0	0	2	0	0
TMHMM	0	0	1	0	0
SCAMPI2	0	0	1	0	0
SOSUI	0	0	1	0	0
TOPCONS	0	0	1	3	0
PRED-TMR	0	1	1	2	0
MINNOU	0	1	1	0	1
Phobius	3	1	1	0	0
hmmTOP	3	0	1	3	0
CCTOP	3	3	1	1	2
TMPRED	1	3	3	6	2
Mobyly	1	0	1	0	1
PHD	1	1	1	2	0
Result	790-807 827-849 851-871	157-176 878-899/902- 923	(SA) 8-28	(SA) 33-64 574-591 604-631	(SP) 5-31 200-221

7.3 Brefeldin A und Wortmannin-Behandlung von *P. tricornutum*-Kulturen

Für die Behandlung von Brefeldin A wurden *P. tricornutum*-Kulturen verwendet, die jeweils die Fusionsproteine ABC3-eGFP, CBS-eGFP und TIP1-eGFP exprimierten. Zur Kontrolle diente eine *P. tricornutum*-Kultur, die das Fusionsprotein PIP1-eGFP exprimierte (Abb. 37 – 40). Für die Behandlung von Wortmannin wurden VCT3-eGFP *P. tricornutum*-Zellen verwendet (Abb. 41).

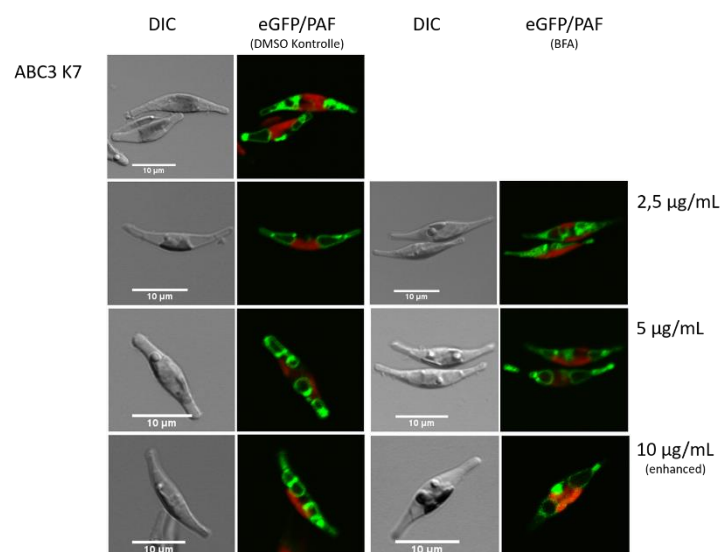


Abbildung 43: Subzelluläre Lokalisation von ABC3-eGFP exprimierenden *P. tricornutum*-Zellen nach Brefeldin A-Behandlung. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Brefeldin A (BFA) behandelt. Als Kontrolle

wurde die *P. tricornutum*-Kultur nur mit DMSO behandelt. DIC: Differentieller Interferenzkontrast; eGFP/PAF: Überlagerung der eGFP und Plastidenautofluoreszenz-Kanals.

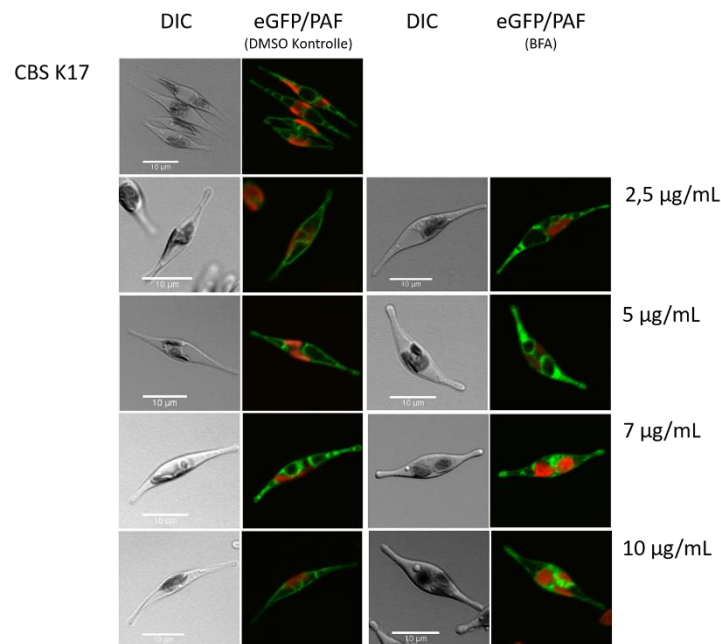


Abbildung 44: Subzelluläre Lokalisation von CBS-eGFP exprimierenden *P. tricornutum*-Zellen nach Brefeldin A-Behandlung. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Brefeldin A (BFA) behandelt. Als Kontrolle wurde die *P. tricornutum*-Kultur nur mit DMSO behandelt. DIC: Differentieller Interferenzkontrast; eGFP/PAF: Überlagerung des eGFP und Plastidenautofluoreszenz-Kanals.

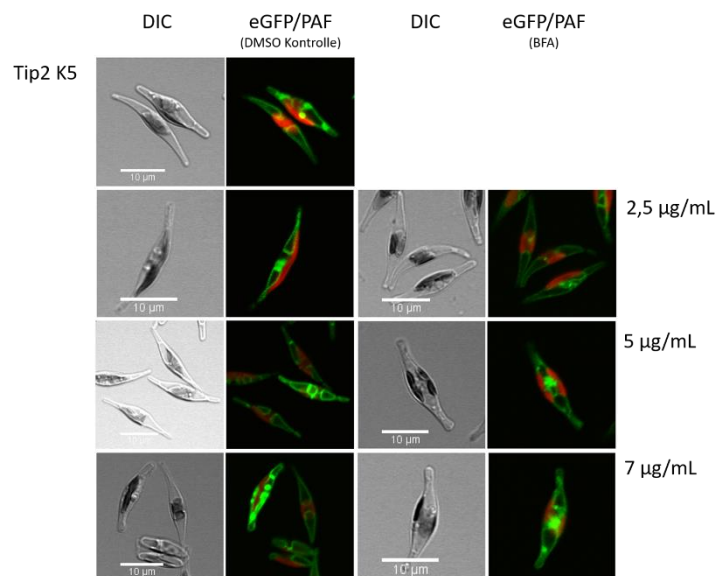


Abbildung 45: Subzelluläre Lokalisation von TIP1-eGFP exprimierenden *P. tricornutum*-Zellen nach Brefeldin A-Behandlung. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Brefeldin A (BFA) behandelt. Als Kontrolle wurde die *P. tricornutum*-Kultur nur mit DMSO behandelt. DIC: Differentieller Interferenzkontrast; eGFP/PAF: Überlagerung des eGFP und Plastidenautofluoreszenz-Kanals.

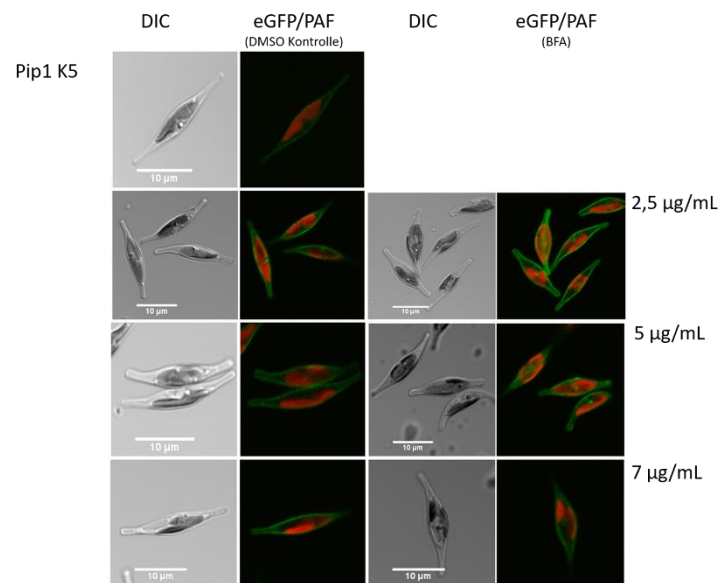


Abbildung 46: Subzelluläre Lokalisation von Pip1-eGFP exprimierenden *P. tricornutum*-Zellen nach Brefeldin A-Behandlung. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Brefeldin A (BFA) behandelt. Als Kontrolle wurde die *P. tricornutum*-Kultur nur mit DMSO behandelt. DIC: Differentieller Interferenzkontrast; eGFP/PAF: Überlagerung des eGFP und Plastidenautofluoreszenz-Kanals.

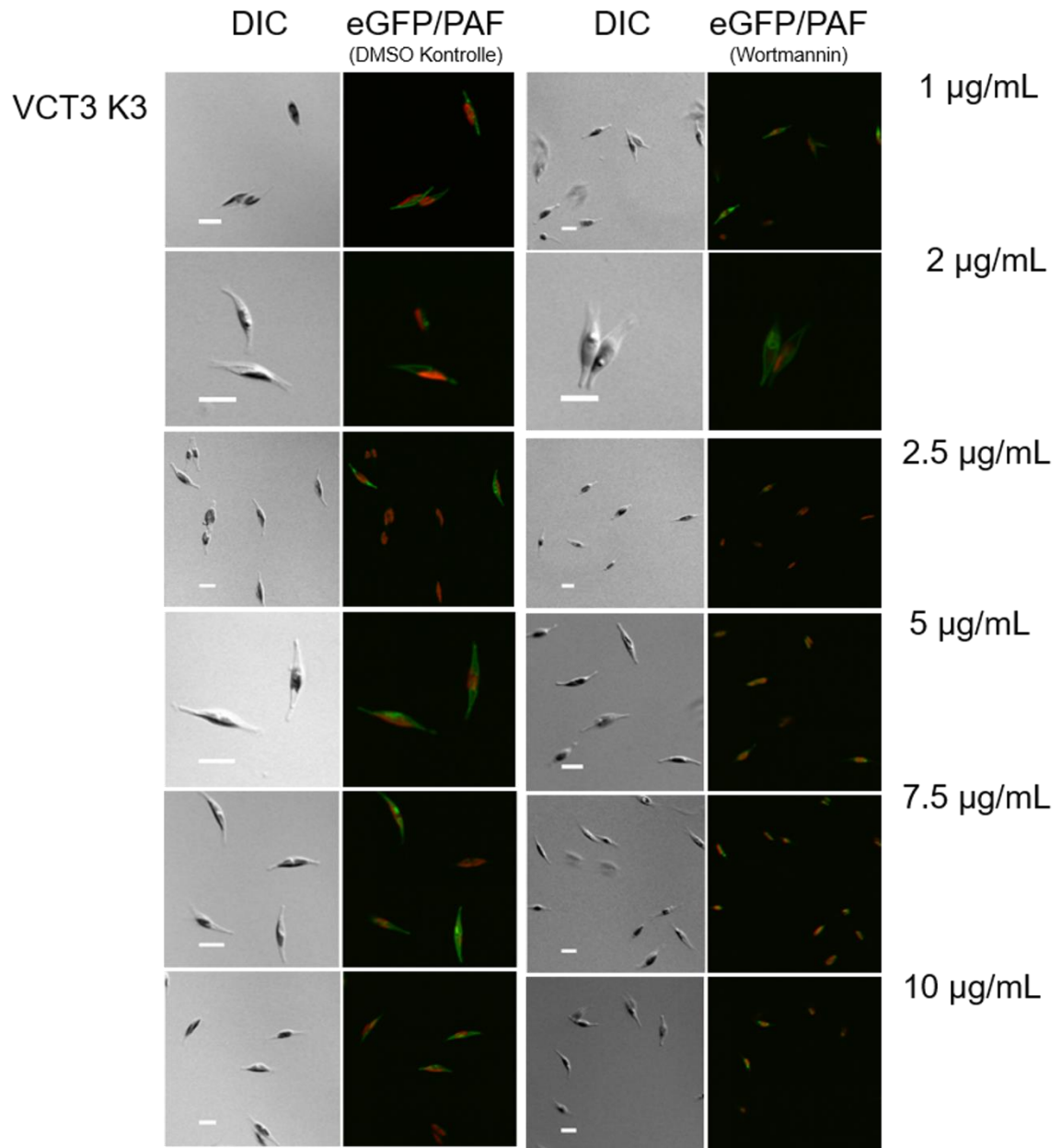


Abbildung 47: Subzelluläre Lokalisation von VCT3-eGFP exprimierenden *P. tricornutum*-Zellen nach Wortmannin-Behandlung. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Wortmannin behandelt. Als Kontrolle wurde die *P. tricornutum*-Kultur nur mit DMSO behandelt. DIC: Differentieller Interferenzkontrast; eGFP/PAF: Überlagerung des eGFP und Plastidenautofluoreszenz-Kanals.

7.4 Self-Assembling GFP

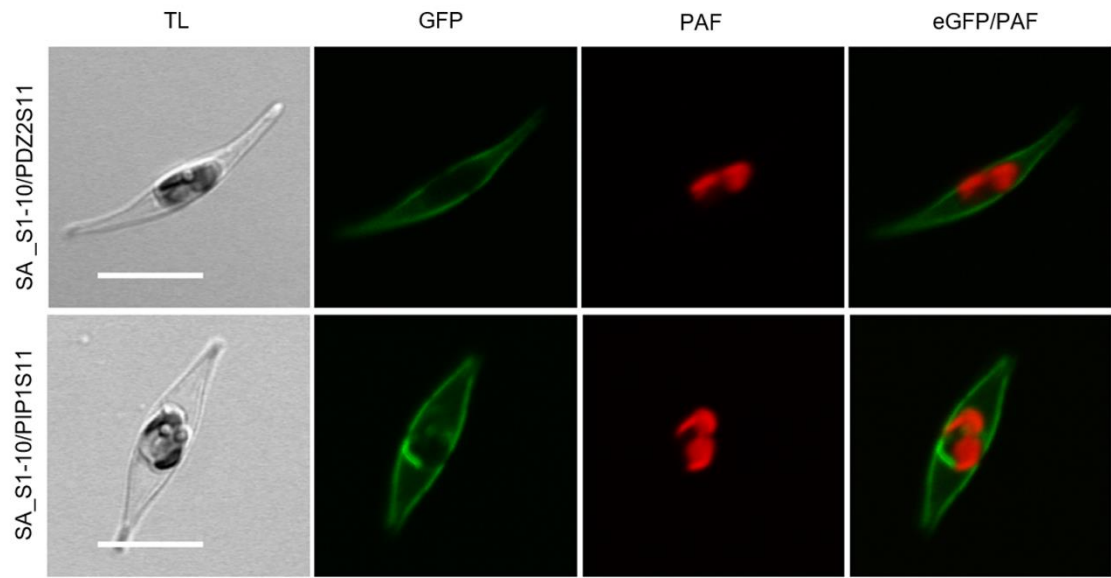


Abbildung 48: Subzelluläre Lokalisation von Self assembling GFP-Fusionskonstrukten. Die Nitrat-induzierte Expression von PDZ2 bzw. PIP1 fusioniert an das GFP11 (S11) und dem GFP1-10 resultierte in einem Fluoreszenzmuster, das auf eine Lokalisation in der Plasmamembran schließen lässt. TL = *Transmitted light*; GFP= *green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*. Maßstab= 10 µm.

7.5 *In silico* Analysen mittels *eukaryotic linear motif resource*

Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Vorhersage von potentiellen Targetingmotiven gezeigt, die aus dem Tool des *eukaryotic linear motif resource* resultierten.

Tabelle 31: Zusammenfassung der potentiellen Targetingmotive von vakuolären Proteinen.

Protein	Potentielles Targetingmotiv	Position des Motivs	E-Wert
45961	YGSI	355-358	2.587e-03
ABC3	YGSI YGLV YAAL YLKV YLFL YLPL YFVF YNAV YDVL YSDM EAQPLL ERYGLV QATTLV EGQSLV RDAQLL ERTVLV	101-104 196-199 356-359 374-377 426-429 451-454 460-463 619-622 715-718 893-896 116-121 194-199 225-230 368-373 776-781 850-855	2.587e-03 2.758e-03
CAT1	YHIV YDDL	141-144 314-317	2.587e-03
CBS	YPIF YAVI YTVI YSRV	65-68 244-247 364-367 385-388	2.587e-03

	YQPV QAHLL DWTSLI RLLPLV QQRHLV RHLVLV ELSALV RQLILI RQRELL EGTPLL	430-433 44-49 118-123 168-173 174-179 176-181 279-284 411-416 535-540 547-552	2.758e-03
β-GLYC1	YVSV YRGF YNKI YQGM YDEL YRYF YTTF YGNL YPPV YQVF EEKLLL EKLLLL QTLWLL QVAVLL QCAVLL QHNALV	51-54 223-226 242-245 392-395 409-412 576-579 596-599 601-604 729-732 854-857 60-65 61-66 69-74 142-147 359-364 478-483	2.587e-03 2.758e-03
MATE1	YEEV YQII YWRM QTNKLV ETTL	139-142 394-397 415-418 42-47 497-502	2.758e-03
MATE2	YFSL YPEV YSVI	4-7 159-162 414-417	2.587e-03
TIP1	YGS YWSL YGIL RFRKLI	15-18 182-185 234-237 126-131	2.587e-03 2.758e-03
TPK2	YDEI YEDF YMLV	29-32 56-59 305-308	2.587e-03
VCT3	YQAV EETPLI	162-165 19-24	2.758e-03
VCT6	YWLI YNLV RQEELL	49-52 545-548 265-270	2.587e-03 2.758e-03

7.6 *In vivo* Lokalisationsstudien

7.6.1 NT_{VCT3}-PIP1-eGFP

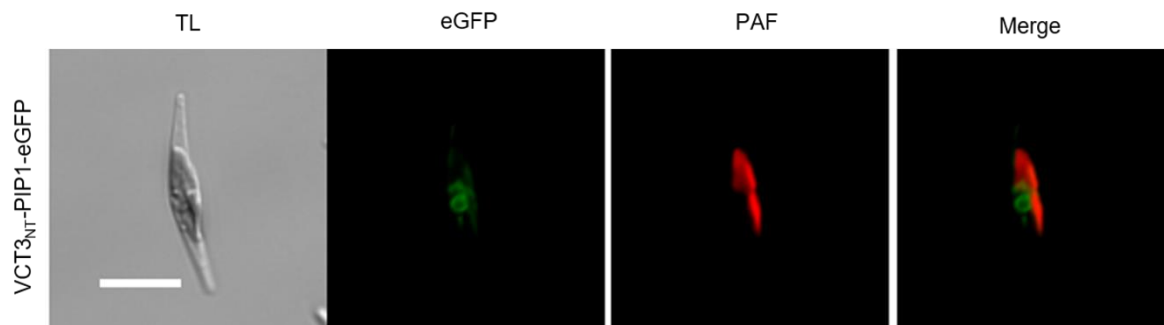


Abbildung 49: Subzelluläre Lokalisation von VCT3_{NT}-PIP1-eGFP. Die Expression von VCT3_{NT}-PIP1 als eGFP-Fusionsprotein zeigte eine Lokalisation im ER. TL= *Transmitted light*; eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge= Überlagerung des eGFP- und PAF-Kanals. Maßstab= 10 μ m.

7.6.2 μ -Untereinheiten der AP-Komplexe

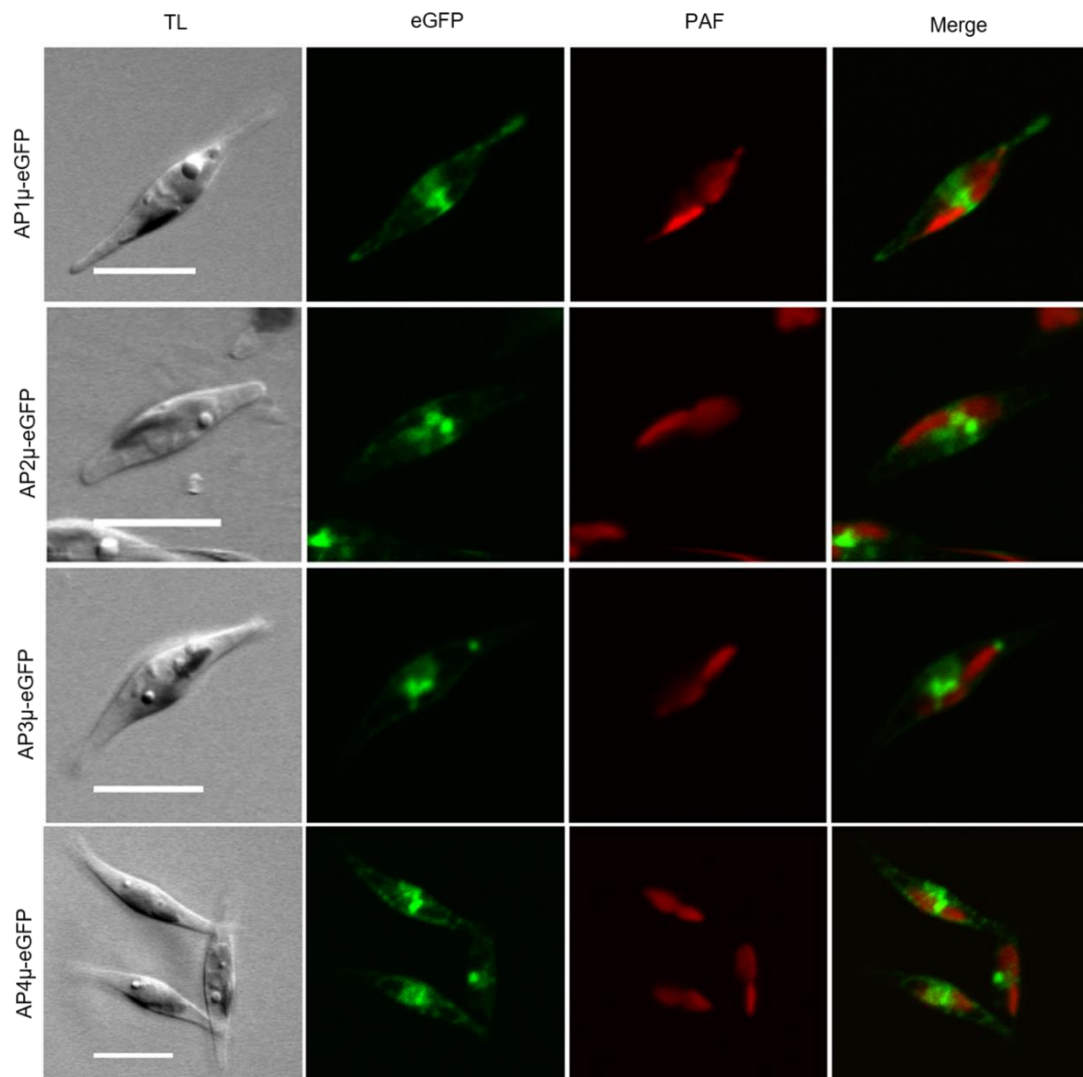


Abbildung 50: Subzelluläre Lokalisationen der μ -Untereinheiten der AP-Komplexe in *P. tricornutum*. Die μ -Untereinheiten der Adapterprotein-Komplexe 1-4 zeigten eine starke, punktförmige Lokalisation in der Mitte der Zelle sowie ein Fluoreszenzmuster, das auf eine Lokalisation im Cytoplasma schließen lässt. TL= *transmitted light*;

eGFP= *enhanced green fluorescent protein*; PAF= *Plastidenautofluoreszenz*; Merge = Überlagerung des eGFP und PAF-Kanals. Maßstab = 10 μm .

7.7 Phylogenetische Analysen

Die Berechnungen der phylogenetischen Stammbäume wurden wie in Kap. 5.2.26 beschrieben mit dem Computerprogramm MEGA7 durchgeführt.

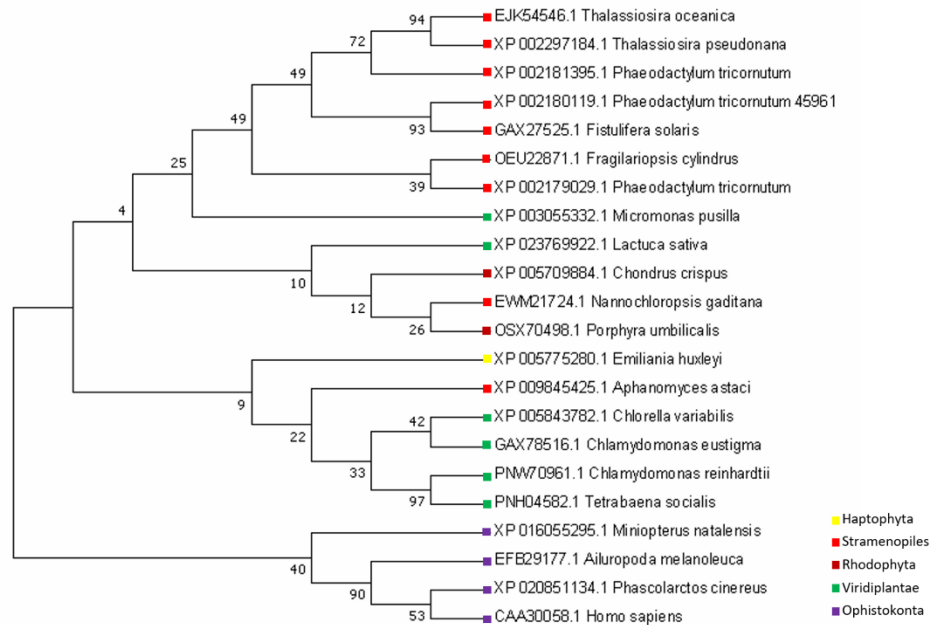


Abbildung 51: Phylogenetische Analyse von 45961. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

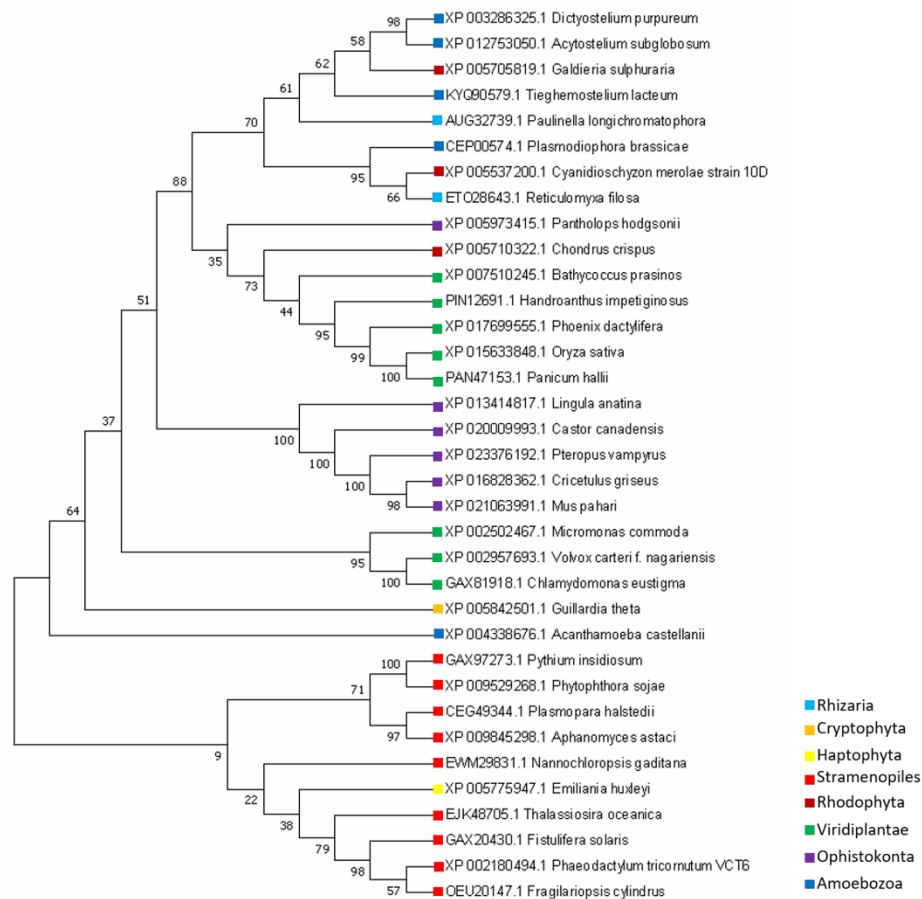


Abbildung 52: Phylogenetische Analyse von VCT6. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

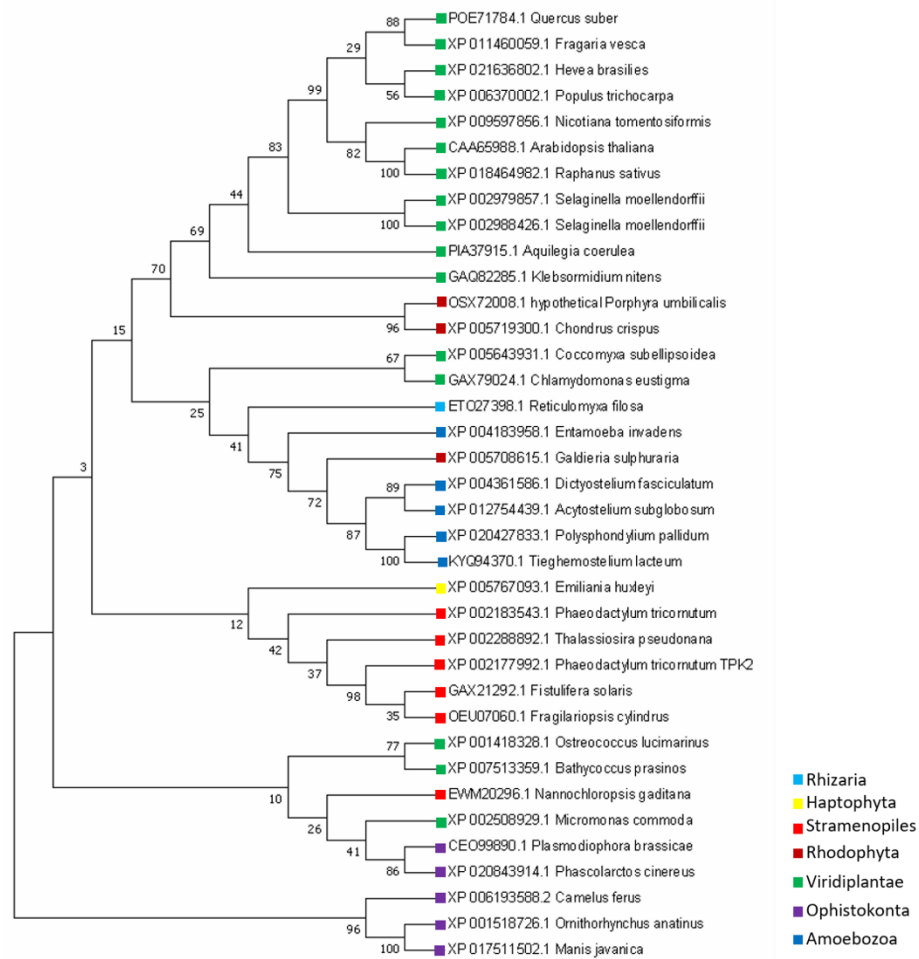


Abbildung 53: Phylogenetische Analyse von TPK2. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

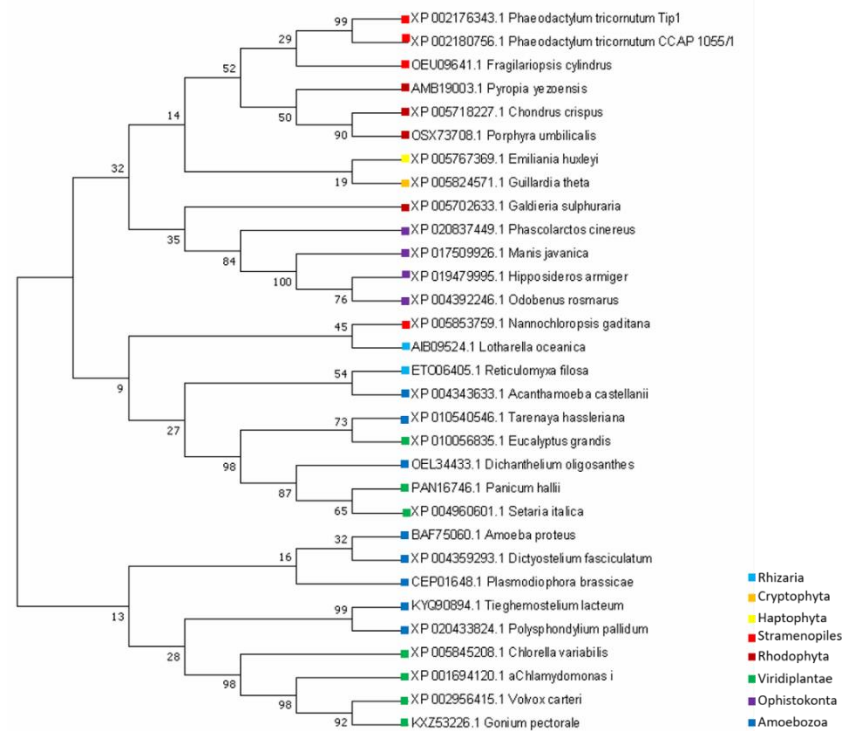


Abbildung 54 Phylogenetische Analyse von TIP1. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

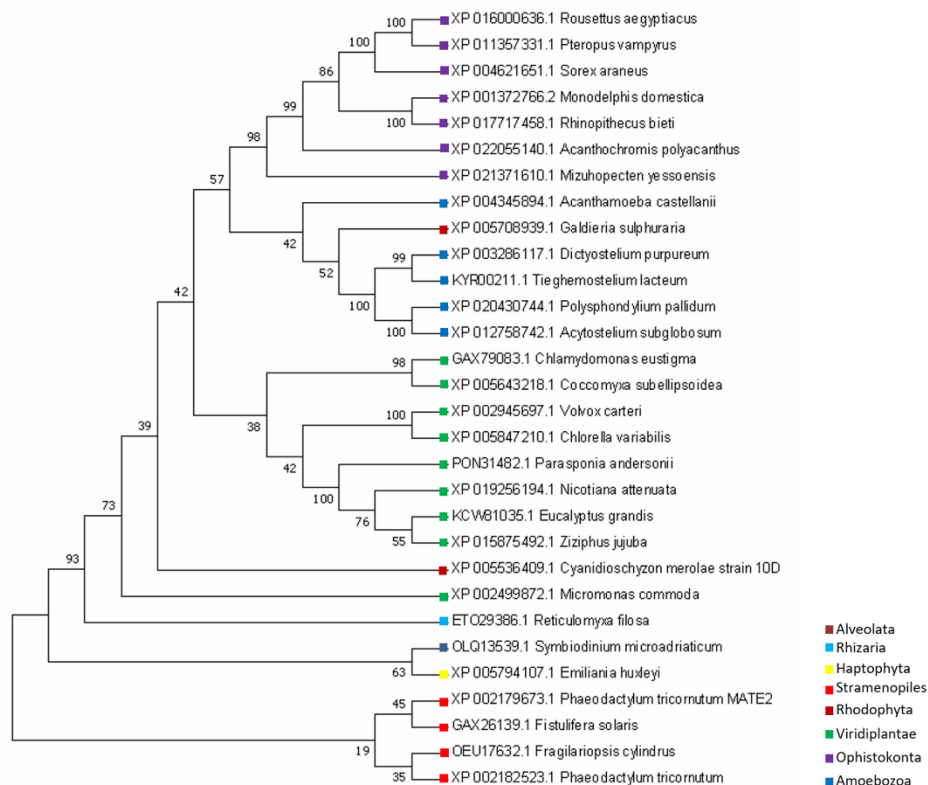


Abbildung 55: Phylogenetische Analyse von MATE2. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.



Abbildung 56: Phylogenetische Analyse von ABC3. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

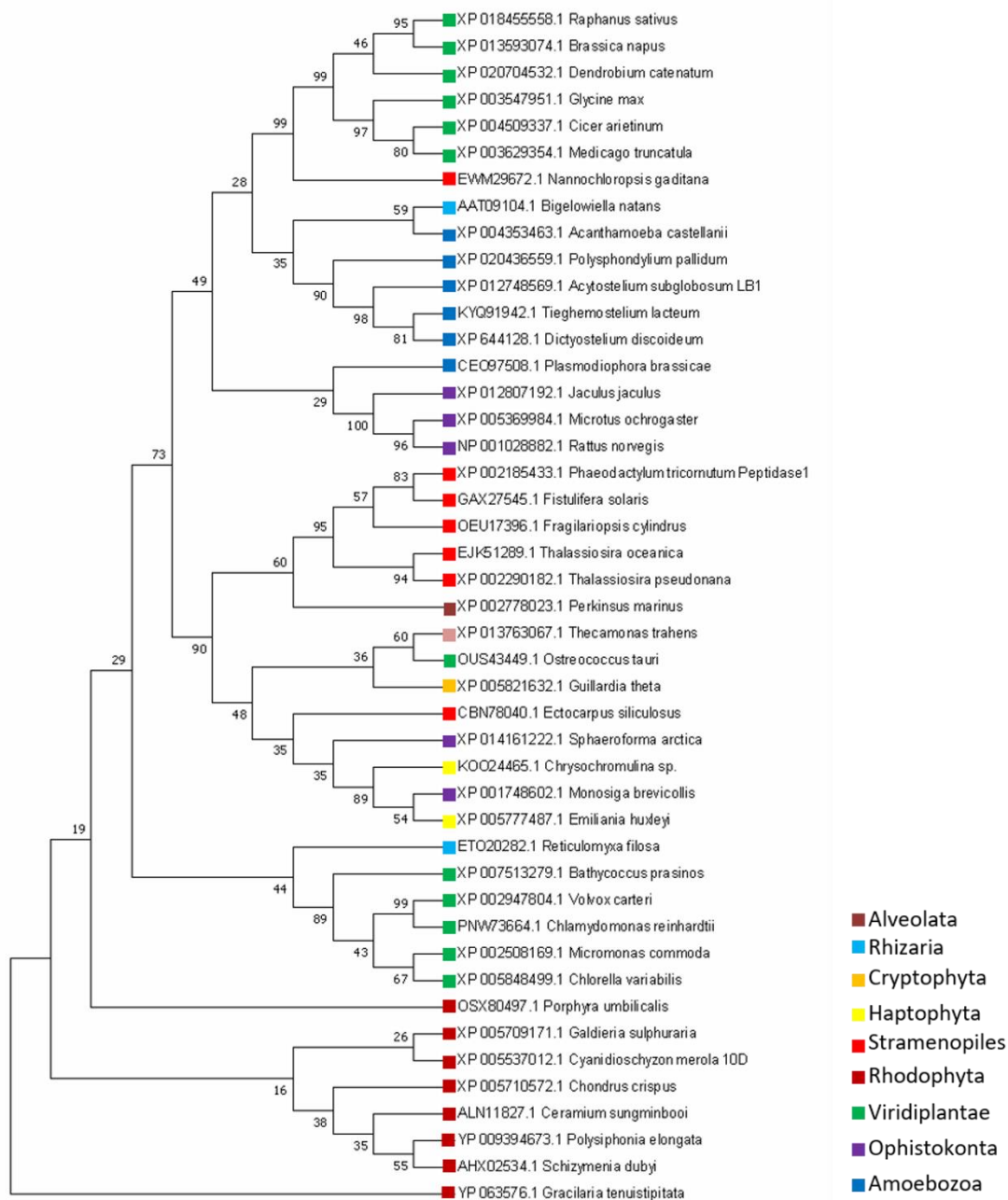


Abbildung 57: Phylogenetische Analyse von Peptidase1. Der Stammbaum wurde anhand der Maximum likelihood Methode basierend auf das JTT-matrix basierende Modell und mit einem Bootstrap von 200 Replikaten berechnet.

7.8 Primer

In den folgenden Tabellen sind die Primer für putative Vakuolenproteine, zur Modifizierung bzw. Mutierung vakuolärer Proteine, Primer für die Generierung von Split-GFP Konstrukten sowie Sequenzierprimer aufgelistet.

Tabelle 32: Verwendete Primer für putative vakuoläre Proteine. Angegeben wurde Bezeichnung der Primer, die Sequenz in 5'-3' Richtung sowie die errechnete Schmelztemperatur (T_m).

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T _m [° C]
9947_Eco_for	GAATTCATGACCTACGGCACCATG	57,4
9447_intern_for	CAGAGGCCAAGCAGGTTCTAGAGC	60,8
9947_intern_rev	GTTCTAGAGCGCATATATCCTG	53,0
9947_BamHI_rev	GGATCCAATAATTTCTCCCTCGTTG	58
SacI_27361_for	GAGTCATGCCATTGCGTCGG	55,9
XbaI_27361_rev	TCTAGATTGGAGTTTCCTATAC	49,2
30620_Eco_for	GAATTCATGGCCCCGCCGACGACTAC	68,8
30620_Bam_rev	GGATCCACAGGTTGATAAAGGGATGTC	59,7
18469_Xba_for	TCTAGAATGAGCCAAAACCAAGGAG	56,0
18469_Bam_rev	GGATCCTGATTTCCACGCAATGTCAG	59,7
45672_Eco_for	GAATTCATGCTCACAGCGGACAAGCG	61,1
45672_Bam_rev	GGATCCATGGCCGAATCCACTGGC	62,5
46251_Mun_for	CAATTGATGAGCCGTTCCCTGGTT	57,4
46251_Bam_rev	GGATCCCTCTACCATTGAAGTCGATCG	61,3
GONST2_Sac_for	GAGCTCATGCCTCCGTCCAAGAAG	60,8
GONST2_Xba_rev	TCTAGACGGGCCGTTACCTTCG	58,6
GONST3_Sac_for	GAGCTCATGAATCTCAAGTCCG	54,8
GONST3_Xba_rev	TCTAGAAGAACGGCGTTTCATGC	55,3
GONST5_Eco_for	GAATTCATGGATCATTGCAACGC	55,7
GONST5_Xba_rev	TCTAGATCGTTTCTTGCGAGTCTGC	57,7
GT1_for_Eco	GAATTCATGTCGTCACTTTGG	51,1
GT1_rev_Xba	TCTAGAGACCATTGGATACGC	52,4
GT3_for_Eco	GAATTCATGATGCCACAGGGAGC	57,1
GT3_rev_Xba	TCTAGAATGTGTCGATGCTGC	25,4
NRT1_for	GAATTCATGTCCGATATCG	43,5
NRT1_rev	TCTAGAGGCTTCAATTC	46,8
NRT2_for	GAATTCATGAACACACGTAATC	51,7
NRT2_rev	TCTAGACGATACGTGTTGTTTCG	53,0
NRT3_for	GAATTCATGTCGGAACTGAC	50,5

NRT3_rev	TCTAGAGGCTTCGATCTCTTC	52,4
NRT4_for	GAATTCATGGCCTCAGCGGC	55,9
NRT4_rev	TCTAGACACAGCGGCGGGTATG	58,6
ABC12_for	GAATTCATGTGTTCTTCCTCGTCAAAGA	58,7
ABC12 over for	CGAATTGTGGTATACTGAAGTCG	53,5
ABC12 over rev	GTCGTCAACGCTTGCGGATTAGC	58,8
ABC12 rev	TCTAGAACTATTCTCCTTCGAAACGC	58,2
ABC13_for	GAATTCATGGAGTACCGGAAAAACGCAC	59,9
ABC13 over 1 for	CCGAATTGATGATAGGAGTGCTGG	57,4
ABC13 over 1 rev	GGAATGAAGAGAATCAAAACCAG	51,7
ABC13 over 2 for	GGTCAAACAGCCAATGAAGGTGG	57,1
ABC13 over 2 rev	GCTCTTCAACAGTCATTATCAATCC	54,4
ABC13 rev	TCTAGACCAGTCGCCTATATTATTG	54,8
ABC14_for	GAATTCATGAAAAGTGGTGTGTATGC	5,5
ABC14 over 1 for	CCAGATATGGACGAACAGCCTTTG	57,4
ABC14 over 1 rev	CGGTGTTTGAGGAACAAAGGC	54,4
ABC14 over 2 for	GGCAATCTTTCCCGTTACAGTG	54,8
ABC14 over 2 rev	GCAGCATCAGCACCCAATAAAT	53,0
ABC14 rev	TCTAGATTGTGATGCATCTGCCATTGC	58,2
ABC5_for	GAATTCATGAACGATTCTTCGTCG	54,0
ABC5 rev	TCTAGACACGTTTCTGTGCGGCCGC	63,3
ABC6_for	GAATTCATGGATACGGGATCTACTGC	58
ABC6 rev	TCTAGACTTTTCTGCCTTGCGCTCAAGC	61,5
28004_fw_MunI_fw	CAATTGATGCCACTGGATCGTTCGAGTGTC	79,5
28004_3'	ACTAGTCGTCGTTTCGAAAGTCTGAATATAGTC	68,3
50592_fw_neu_EcoRI	GAATTCATGAGGATTGGTTCTGTTTTCGC	72,7
50592_rv_BGIII_neu	AGATCTATTTTGAAGAGGATCACGC	66,4
Primer 33940 fw	GAGCTCATGAAGATTCTCTCGTCTCTCGTCC	74,5
Primer 33940 rev	TCTAGAGAAAACAAAGACGAGCAAACCTTGCG	73,0
42953_fwEcoRI	GAATTCATGACGCTCTTTCGTCTCGCC	75,2
46131_fwEcoRI	GAATTCATGACGATGACATTCTCCTTC	70,8
48084_fwSacl	AGATCTATGATGAAAAACACGAGTGC	65,2
28004_fw_MunI_fw	CAATTGATGCCACTGGATCGTTCGAGTGTC	79,5
28004_3'	ACTAGTCGTCGTTTCGAAAGTCTGAATATAGTC	68,3
50592_fw_neu_EcoRI	GAATTCATGAGGATTGGTTCTGTTTTCGC	72,7
50592_rv_BGIII_neu	AGATCTATTTTGAAGAGGATCACGC	66,4
Primer 33940 fw	GAGCTCATGAAGATTCTCTCGTCTCTCGTCC	74,5
Primer 33940 rev	TCTAGAGAAAACAAAGACGAGCAAACCTTGCG	73,0

42953_fwEcoRI	GAATTCATGACGCTCTTTCGTCTCGCC	75,2
46131_fwEcoRI	GAATTCATGACGATGACATTCCTCCTTC	70,8
48084_fwSacl	AGATCTATGATGAAAAACACGAGTGC	65,2
49793C_Sacl_fw	GAGCTCATGAGCAATACGAACAAGGC	71,2
49793C_XbaI_rv_neu	TCTAGAGTTTCGTTTAAATAAACAGGC	62,6
49793_int_MunI_fw	CAATTGTCCAAGAGGACATACTCG	65,5
49793_int_MunI_rv_neu	CAATTGGAAAGGTTTCGGCG	68,4
49793N_XbaI_fw	TCTAGAATGAGCAATACGAACAAGGC	67,0
49793N_HindIII_rv_neu	AAGCTTTAGTTTCGTTTAAATAAACAGGC	65,7
26742_seq_fw	GGGTTGGACTGGTCAGTGGC	69,2
26742_seq_rv	GCCGACGCACACCAGCACACG	78,9
35668_EcoRI_fw	GAATTCATGCCTTCTTGCTTCAGGAT	69,8
35668_XbaI_rv	TCTAGATTTCCAGTGTCCAGACAGTA	64,9
50351_EcoRI_fw	GAATTCATGTCTCGAGAGGTCAGCAATG	72,0
50351_XbaI_rv	TCTAGATGGCTTAATGTCCAAGA	61,5
50463_EcoRI_fw	GAATTCATGCCAGCAATGCTCTTCC	72,1
50463_XbaI_rv_neu	TCTAGAATTGACGGTAGTAGGTTTCG	63,3
49793C_gib_fw	CACTTGTGCGAACGGAATTCATGAGCAATACGAACAAGG	82,2
49793C_gib_rv	GCCCTTGCTCACCATTCTAGAGTTTCGTTTAAATAAACAGGC	78,4
49793N_gib_fw	GACGAGCTGTACAGGTCTAGAATGAGCAATACGAACAAGG	77,9
49793N_gib_rv	CTAGTCTTAAAGTAAATTGAAGCTTTAGTTTCGTTTAAATAAACAGGC	72,1
26742_gib_EcoRI_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGGTGGCGGAAAAACAAATC	87,5
45128_gib_XbaI_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAGTCTGTTCGTCTGTAC	84,1
35668_gib_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGCCTTCTGCTTCAGG	86,5
35668_gib_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGATTTCCAGTGTTCCAGAC	83,7
50351_gib_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGTCTCGAGAGGTCAGC	85,4
50351_Teil1_gib_rv	CCAAGGCTAACACCCTGAACAATAGC	69,8
50351_Teil2_gib_fw	GGTGTTAGCCTTGCGGGTACTTTGC	74,5
50351_gib_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGATGGCTTAATGTCCAAG	82,9
50463-s11_gib_pep_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGCCAGCAATGCTCTTC	87,2
50463-s11_gib_pep_rv	CATCGGATCCTCTAGAATTGACGGTAGTAGG	71,6
50463-s11_gib_s11_fw	CAATCTAGAGGATCCGATGGAGGGTCT	72,0
50463-s11_gib_s11_rv	CTAGTCTTAAAGTAAATTGAAGCTTGGTACCTTATGTAATCC	69,7
VSR1_gfp_gib_fw	CACTTGTGCGAACGGAATTCATGACGCTCTTTCGTCTC	83,2
VSR1_gfp_gib_rv	GCCCTTGCTCACCATTCTAGAATGTCCAGATACTCCGCTTTC	81,8
VSR1_his_gib_fw	CACTTGTGCGAACGGAATTCATGACGCTCTTTCGTCTC	83,2
VSR1_his_gib_rv	CTAGTCTTAAAGTAAATTGAAGCTTTAGTGATGGTGATGGTG	73,1
VSR2_gfp_gib_fw	CACTTGTGCGAACGGAATTCATGACGATGACATTCCTC	82,7

VSR2_gfp_gib_rev	GCCCTTGCTCACCATTCTAGAATGATAGGCCTTTTCCTTTTG	80,6
VSR2_his_gib_fw	CACCTGTGCGAACGGAATTCATGACGATGACATTCCTC	82,7
VSR2_his_gib_rev	CTAGTCTTAAAGTAAATTGAAGCTTTAGTGATGGTGATGGTG	73,1
MunI_TPK1_for	CAATTGATGCAAAATGATATTCG	62,8
XbaI_TPK1_rev	TCTAGAAAATCTTGCCTCATTG	63,3
MunI_TPK2_for	CAATTGATGCACATCATCAACGCC	72,0
XbaI_TPK2_rev	TCTAGACCCCGCCAAAGACGAACG	74,3
EcoRI_TPK3_for	GAATTCATGACACTATACAAGAAAACC	61,6
XbaI_TPK3_rev	TCTAGACCCCTTTACCTTCGCTCC	68,2
EcoRI_TPK4_for	GAATTCATGACGACTCCCTGTGG	68,6
XbaI_TPK4_rev	TCTAGAGTCTTTGACATTGGCACC	65,3
SacI_TPK5_for	GAGCTCATGAGTGACACGGCCGATGC	78,7
BamHI_TPK5_rev	GGATCCGCTTTGCTGACCCTGAATGTCG	79,4
EcoRI_Glyc3_for	GTCACCACTTGTCGGAACGGAATTCATGCCTTCTTGCTTCAGG	85,4
XbaI_Glyc3_rev	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGATTTCCAGTGTTCCAGAC	83,7
EcoRI_Glyc4_Part1_rev	CCAAGGCTAACACCCTGAACAATAGC	69,8
XbaI_Glyc4_Part1_fw	GTCACCACTTGTCGGAACGGAATTCATGTCTCGAGAGGTCAGC	85,4
EcoRI_Glyc4_Part2_rev	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGATGGCTTAATGTCCAAG	82,9
XbaI_Glyc4_Part2_fw	GGTGTTAGCCTTGGCGGGTACTTTGC	74,5
SacI_47769_for	GAGCTCATGGAATCTAGTGAAAAC	74,0
BamHI_47769_rev	GGATCCCAAAAGCTGGTCTTTC	63,0
GA5'_ABC3	CACCTGTGCGAACGGAATTCATGTCGACCGCCGTGGCT	82,0
GA_3'_ABC3(GFP)	GCCCTTGCTCACCATTCTAGAGACGATCGTGGAATCATC	78,0
ABC3 5'SacI	GAGCTCATGTCGACCGCGTGGCTTC	78,0
dC ABC3 3' BamHI	GGATCCGTGCAGTTGCATATTCCAC	70,0
GA_5'_TIP1CT	CACCTGTGCGAACGGAATTCATGGCTTCCATTATCAACATCATG	76,0
GA_5'_eGFP_Tip2CT	GGCCGGAAATGGTGAGCAAGGGCGAG	79,0
GA_3'_TIP1CT_GFP	CTCACCATTTCGGCCGGAAAATGGT	74,0
GA_3'_Egfp	GCCTGCAGGTCGACTCTAGATTACCTGTACAGCTCGTCC	79,0
GA_5'_Tip2 N-trunc	CACCTGTGCGAACGGAATTCATGGCTCTACGGAACATAC	77,0
GA_5'_Tip2	CACCTGTGCGAACGGAATTCATGGTAGATTCAAAGTCAATCAAAG	74,0
GA_5'_VCT3-Ntrunc	CACCTGTGCGAACGGAATTCATGAACAACTCTGCAAGC	76,0
GA_3'_VCT3(GFP)	GCCCTTGCTCACCATTCTAGAACAGGTTGATAAAGGGATG	76,0
2a (for VCT2/GFPTM10/11)	CTGGACGATAATGGTGAGCAAGGGCGAG	75,0
3a (for VCT2/GFPTM10/11)	GCTGTACAGGAATTCGGAAATTTATCCCCTTC	70,0
1b (rev VCT2/GFPTM10/11)	TGCTCACCATTATCGTCCAGGGCAAGCC	77,0
2b(rev VCT2/GFPTM10/11)	TTTCCGAATTCCTGTACAGCTCGTCCATG	72,0
1a (for VCT2/GFPTM10/11)	GTCACCACTTGTCGGAACGGAATTCATGCCATTGCGTCGGGGT	83,0

150

VSR3_trunc_his_mitte_fw	ACGATGATTTGACCAAGGGC	66,0
VSR1_trunc_his_BamHI_rv	GGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGTCCAGATACTCCGC	88,7
VSR1_trunc_gfp_BamHI_rv	GGATCCATGTCCAGATACTCCGC	69,6
VSR1_trunc_his_mitte_fw	TAATCGAATTTGAACAGCGC	62,6
VSR2_trunc_his_XbaI_rv	TCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGATAGGCCCTTTTCC	84,9
VSR2_trunc_gfp_XbaI_rv	TCTAGAATGATAGGCCCTTTTCC	61,3
VSR2_trunc_his_mitte_fw	TGTATTTGGGAGCATTTTGC	62,4
VSR3_trunc_his_HindIII_rv	AAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGTGAGACTCCCAGATCCG	89,4
VSR3_trunc_gfp_SpeI_rv	ACTAGTTGAGACTCCCAGATCCG	66,7
VSR3_trunc_his_mitte_fw	ACGATGATTTGACCAAGGGC	66,0
TPK2_Mut1_Part1 rev	AAGCCGACGAGGCTCCGTCCAACGACGAGGA	69,1
TPK2_Mut1_Part2 fw	GAGGCTCCGTCCAACGACGAGGAGCATC	66,8
TPK2_Mut2_Part1 rev	GAGGCTGAAGATGCTTCGCATTCTGGAG	64,3
TPK2_Mut2_Part2 fw	GATGCTTCGCATTCTGGAGTGCCTTGC	66,3
TPK2_Mut3_Part1 rev	GATTGCCATGCTGGCGGCTCTCCAAAAGGTGG	64,3
TPK2_Mut3_Part2 fw	GGCGGCTCTCCAAAAGGTGGAGAAAGCAGACG	67,2
pPha-NR+eGFP_for	GTCACCACTTGTCGCAACGGAATTCATGCACATCATCAACGCCCTTTTTCAG	70,5
pPha-NR+eGFP_rv	CGTTCGTCTTTGGCGGGGTCTAGAAATGGTGAGCAAGGGCGAGG	84,0
GA5'_Pip1_dTM1	CAATGCCGTTACCGGTGCGACGCTCGTTG	79,0
GA3'_TIP1_TM1	TGCGACCGGTAACGGCATTGGCGGCACA	83,0
GA3'_Pip1(GFP)	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAGGCCTGAGGCGCGGCGTT	83,0
GA5'PIP1(VCT1-4)	AGTGCTGGTAACCGGTGCGACGCTCGTTG	82,0
GA3'_VCT3_TM1-4	TGCGACCGGTTACCAGCACTCGTCCAACAGCCTG	82,0
GA5'_PIP1dTM(VCT3)	ATTTGGATACACCGGTGCGACGCTCGTTG	76,0
GA3'_VCT3_TM1	TGCGACCGGTGTATCCAAATTGCAACGAGCTTCCCAATGTGAC	80,0
GA_5'_dC_ABC3	CACTTGTCGAACGGAATTCATGTCGACCGCCGTGGCT	82,0
Tip2_5'_Mut	CGGAACATACCGTCGACGCGGCGGCCGCGGCGAGGTCCCTTTCCG	93,0
Tip2_3'_Mut	CGGAAAGGGACCTGCCGCGGCGGCCGCTGCGACGGTATGTTCCG	93,0
5'EcoRI_tip2dn	GAAATTCATGTTGATTGCAGAAGTG	62,0
5'SacI_NVCT3_PDZ2	GAGCTCATGGCCCCGCCGACGACTACGGAGACGACGAGCGGACACTTCTCTCTGACGAGGAGACGCCCTTGATAAAGATGGCGAAAGTCGAGTCC	91,0
5'NVCT3_PIP1	GAAATTCATGGCCCCGCCGACGACTACGGAGACGACGAGCGGACACTTCTCTCTGACGAGGAGACGCCCTTGATAGCTTCCATTATCAACATCATGAACACG	82,0
GA5'VCT3YMut	GTCACCACTTGTCGAACGGAATTCATGGCCCCGCCGACGAC	86,0
5'EcoRI_VCT3-LI/AA	GAAATTCATGGCCCCGCCGACGACTACGGAGACGACGAGCGGACACTTCTCTCTGACGAGGAGACGCCCGCGGCAACAACCTCTGCAAGCC	93,0
5'VCT3YMut2	CCAGGCTGCTGGACGAGTGCTGGTAGGG	81,0
5'VCT3_TMut	TAGGGATCGTTGACGAATTGCAACGGCTGTGG	78,0
3'VCT3_TMut	CCAGCACTCGTCCAGCAGCCTGGGCCACCAAACT	86,0
GA3'VCT3YMut2	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAACAGGTTGATAAAGGGATGTCAC	79,0

45961_3'_Mut	TCTAGAATCCGTCGTCAGGGCTATTGCCTCTGCCGATCCGGCCGATTACCTTCCGACCTGCTTGCATAGGTATTGC	88,0
GA_5'_49561	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGACGAAAAGGTTGGCTG	79,0
GA_3'_49561	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAATCCGTCGTCAGGGCTATTG	81,0
GA5'_ABC3YMut	CAGTGCCGAAACAGGGACGAACGGTTCTATC	76,0
GA3'_ABC3YMut	TCGTCCCTGTTTCGGCACTGCCGGCAGT	82,0
3'XbaI_ABC3_Y2Mut	TCTAGAGACGATCGTGGACTCATCCGCTAGATGAGGCAAGCTCAGTTGGCTCGTGGCTCCGGAGGTAGAGTGCAGTTGCATATTCACGCATCAGAAGCTACTCCATTCTGG	88,0
TIP1_5'_Mut2	TCCGCCCAAGGAGCTAGCAGCC	77,0
TIP1_3'_Mut1	CCCGGCTCCTTGACTTTCTGG	71,0
GA_5'_Chi-PDZ2	CACCTGTGCGAACGGAATTCATGCACTCTCCAATCCGAC	78,0
GA_5'_Chi-CBS(Chi-PDZ2)	CCGGGGGACCCATATCACTGCTCCTCG	79,0
GA_3'_Chi-PDZ2(Chi-CBS)	GATATGGGTCCCCGGCAACTAGAAAG	83,0
GA_3'_Chi-CBS	GCCCTTGCTCACCATTCTAGATTCCGGCCGGAAAATGGT	80,0
ABC3mutE/A_for	CGGTTCTATCGTGGCTTTCGCAGCACAGCCGTTGCTTGC	82,0
ABC3mutE/A_rev	GATTCTGATGCAAGCAACGGCTGTGCTGCGAAAGCCACG	83,0
ABC3mutE/A_LL/AA_for	CGGTTCTATCGTGGCTTTCGCAGCACAGCCGGCGGCTGC	87,0
ABC3mutE/A_LL/AA_rev	GATTCTGATGCAGCCGCCGGCTGTGCTGCGAAAGCCACG	86,0
ABC3mutEGTPLL_for	GGTTCTATCGTGGCTTTCGAAGGAACGCCGTTGCTTGCA	81,0
ABC3mutEGTPLL_rev	GGATTCTGATGCAAGCAACGGCGTTCTTCGAAAGCCAC	80,0
ABC3mutLL/AA_for	CGTGGCTTTCGAAGCACAGCCGGCGGCTGCATCAGAATC	84,0
ABC3mutLL/AA_rev	GCATCCATGGATTCTGATGCAGCCGCCGGCTGTGCTTCG	84,0
ABC3mutP/A_for	CGGTTCTATCGTGGCTTTCGAAGCACAGGCGTTGCTTGC	81,0
ABC3mutP/A_rev	GATTCTGATGCAAGCAACGCCTGTGCTTCGAAAGCCACG	80,0
Exchange_3'E/A	TCTAGATTCCGGCCGGAAAATGGTAGGAGTATTGTACATTTTGTTGGTTCAGTAAGGGCGTGCCTGCAGTGCT	85,0
Exchange_3'_E/A_LL/AA	TCTAGATTCCGGCCGGAAAATGGTAGGAGTATTGTACATTTTGTTGGTTCAGTGCCTGCAGTGCT	85,0
Exchange_3'_LL/AA	TCTAGATTCCGGCCGGAAAATGGTAGGAGTATTGTACATTTTGTTGGTTCAGTGCCTGCAGTGCT	85,0

Tabelle 34: Verwendete Primer für die Generierung von Split-GFP Konstrukten. Angegeben wurde Bezeichnung der Primer, die Sequenz in 5'-3' Richtung sowie die errechnete Schmelztemperatur (T_m).

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T _m [° C]
GA_5'_(NGFP)AP2μ	CAACGTCTATATCATGGCCAGATCTATGATTTCCATGATCATGG	73,0
GA_3'_AP2μTAA	GTCTTAAAGTAAATTGCCGCGTTAAATTCGAATTTGGTAGGAAC	73,0
GA_5'_(NGFP)AP3μ	CAACGTCTATATCATGGCCAGATCTATGCAATCCCTGTTCAATC	75,0
GA_3'_APμTAA	GTCTTAAAGTAAATTGCCGCGTTAGCTACACCGCACTTG	76,0
GA_5'_(NGFP)AP4μ	CAACGTCTATATCATGGCCAGATCTATGATAAGCAATTTTTTCGTCTTG	73,0
GA_3'_AP4μTAA	GTCTTAAAGTAAATTGCCGCGTTACACTCGGCAACGCTAG	76,0
GA_5'_SpeI_N-GFP	GTCACCACTTGTGCGAACGACTAGTATGCCCGGAGGAGGAGGACCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG	89,0

NEB_5'_NGFP	GTCACCACTTGTGCGAACGACTAGTACTAGTATGCCCGGAGGAG	90,0
NEB_5'_AP1μ	GGCCAGATCTATGGTTGCTTCGGCCGTC	77,0
GA_3'_AP1μTAA	GTCTTAAAGTAAATTGCCGCGGTATGCCATTCTTAAGTGGTAGTCAC	75,0
NEB_3'_AP1μ	GTCTTAAAGTAAATTGCCGCGGTGCCATTCTTAAGTGGTAGTCAC	76,0
NEB_3'_N-GFP	AAGCAACCATAGATCTGGCCATGATATAGACG	71,0
GA_5'_N-GFP(AP1μ)	AAGAATGGCAAGATCTCCCGGAGGAGGAG	75,0
GA_SpeI_5'_AP1μ	GTCACCACTTGTGCGAACGACTAGTATGGTTGCTTCGGCCGTC	81,0
GA_SacII_3'_N-GFP	GTCTTAAAGTAAATTGCCGCGGTAGGCCATGATATAGACGTTGTG	76,0
GA_3'_AP1μ(N-GFP)	CGGGAGATCTTGCCATTCTTAAGTGGTAGTCAC	73,
GA_EcoRI_5'_CBS(CGFP)	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGATTCCGAGGTACGCG	80,0
GA_5'_CGFP(CBS)	CCGGCCGGAATCTAGAATGCCCGGAGGAG	80,0
GA_3'_CBS(CGFP)	GCATTCTAGATTCCGGCCGGAATGTTAG	73,0
GA_HindIII_3'_CGFP	CTAGTCTTAAAGTAAATTGAAGCTTACCTGTACAGCTCGTCCATG	73,0
GA_SpeI_5'_Ap2μ	GTCACCACTTGTGCGAACGACTAGTATGATTTCATGATCATGG	76,0
GA_3'_AP2μ(N-GFP)	TGGGTCTCCTCCTCCGGGAGATCTAAATTCGAATTTGGTAGGAAC	79,0
GA_SpeI_5'_AP3μ	GTCACCACTTGTGCGAACGACTAGTATGCAATCCCTGTTTCATT	77,0
GA_3'_AP3μ(N-GFP)	CTATTTCAAGTGCGGTGTAGCAGATCTCCCGGAGGAGGAGGACCCA	83,0
GA_SpeI_5'_AP4μ	GTCACCACTTGTGCGAACGACTAGTATGATAAGCAATTTTTTCGTCTTGTG	76,0
GA_3'_AP4μ(N-GFP)	GTTCTACGTTTGCCGAGTGAGATCTCCCGGAGGAGGAGGACCCA	84,0

Tabelle 35: Verwendete Sequenzierprimer. Angegeben wurde Bezeichnung der Primer, die Sequenz in 5'-3' Richtung sowie die errechnete Schmelztemperatur (T_m).

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	T _m [° C]
pJet1.2_fw	GCACAAGTGTTAAAGCAGTT	61,0
pJet1.2_rev	CTCTCAAGATTTTCAGGCTGTAT	62,0
pPhaNR fw	GGTCGGGTTTCGGATCCTTCC	70,0
pPhaNR rev	GATGAACATAAAACGACGATGAG	61,0
eGFP 5' raus	GGCAGCTTGCCGGTGGTGAGATG	78,0
pPha 2NR MCSI fw	GCTTAACTATGCGGCATCAG	64,0
pPha 2NR MCSI rev	CTAACGCAGCTTAGACATAAAC	61,0
pPha 2NR MCSII fw	GTTTATGTCTAAGCTGCGTTAG	61,0
pPha 2NR MCSII rev	GTCTTATCCAGGTCCAAACAGATTG	65,0

7.9 Lösungen und Medien

7.9.1 Puffer und Lösungen

Lösungen zur Isolierung von genomischer DNA:

Aqua PCI

Phenol	50 % (v/v)
Chloroform	48 % (v/v)
Isoamylalkohol	2 % (v/v)

2x CTAB

Tris pH 8	0,1 M
NaCl	1,4 M
Na2EDTA (pH 8,6)	20 mM

Lösungen zur Isolierung von gesamt RNA:

NAES

NaCH3OOH pH 5,1	30 mM
EDTA	10 mM
SDS	1 % (w/v)

Aqua PCI

Phenol	50 % (v/v)
Chloroform	48 % (v/v)
Isoamylalkohol	2 % (v/v)

CI

Chloroform	96 % (v/v)
Isoamylalkohol	2 % (v/v)

Agarosegelelektrophorese

10 x TBE-Puffer

Tris	1 M
Börsäure	0,83 M
Na2EDTA	10 mM
dH2O	Ad 1 L

6 x DNA-Ladepuffer

Harnstoff	4 M
EDTA	50 mM
Saccharose	50 % (w/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Xylencyanol	0,1 % (w/v)

Pufferlösungen für Klonierungsarbeiten

10 x SDB-Puffer

Tris (pH 7)	30 mM
KoAc	50 mM
MgAc	10 mM
Spermidin	4,9 mM
DTT	5 mM

Gibson Reaktionsmix

5 x Isothermal MM	320 µL
T5 Exonuklease (10 U/µL)	0,64 µL
Phusion Polymerase (2 U/µL)	20 µL
Taq DNA-Ligase (40 U/µL)	0,16 µL
ddH ₂ O	860 µL

5 x Isothermal Mastermix

Tris-HCl pH 7,5 (1 M)	3 mL
MgCl (1 M)	300 µL
dGTP (100 mM)	60 µL
dATP (100 mM)	60 µL
dCTP (100 mM)	60 µL
dTTP (100 mM)	60 µL
DTT (1 M)	300 µL
PEG- 800	1,5 g
NAD (10 mM)	300 µL

Reaktionsmix zu 20 µL aliquotieren und bei – 20 °C lagern

Puffer zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen**TFBI**

RbCl ₂	100 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	50 mM
KAc	30 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mM
Glycerin	

TFBII

MOPS	10 mM
RbCl ₂	10 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	75 mM
Glycerin	15 % (w/v)
	15 % (w/v)

pH jeweils auf pH 5,8 einstellen (TBFI mit 0,2 M Essigsäure, TBFII mit NaOH) und steril filtrieren.

Puffer für die Isolation von Plasmid-DNA**P1-Puffer**

Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNAse A	100 µg/mL

P2-Puffer

NaOH	200 mM
SDS	1 % (v/v)

P3-Puffer

Kaliumacetat	3 M
--------------	-----

pH 8,0

pH 5,1

P1- und P3-Puffer wird bei 4°C gelagert.

Biolistische Transfektion

Spermidin	0,1 M
CaCl ₂	2,5 M

Puffer zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakt**Lysepuffer**

NaOH	1,85 M
β-Mercaptoethanol	7,5 % (v/v)

β-Mercaptoethanol wird frisch dazu gegeben.

Puffer für die Carbonatextraktion**Solubilisierungspuffer A**

NaCl	50 mM
Imidazol/HCl pH 7,0	50 mM
6-Aminocaprinsäure	2 mM
EDTA	1 mM
Sucrose	8,5 % (w/v)

Carbonatpuffer

NaHCO ₃ (pH 11,5)	100 mM
------------------------------	--------

Protease Inhibitor Cocktail (PIC)

Antipain	200 µg/mL
Cymostatin	200 µg/mL
Aprotinin	200 µg/mL
Trypsin-Inhibitor	200 µg/mL
Pepstatin A	200 µg/mL
Leupeptin	200 µg/mL
Elastatinal	200 µg/mL
Na ₂ EDTA	200 µg/mL

PMSF (SL)

100 mM

Die Proteinase-Inhibitoren wurden frisch zu den Puffern dazu gegeben (PIC 1: 200; PMSF 1:100).

Präzipitation von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA)**TCA (SL)**

70 % (w/v)

Aceton

80 % (v/v)

Lösungen zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Amidoschwarz**Amidoschwarz-Färbelösung**

Methanol	90 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Amidoschwarz 10 B	0,01 % (w/v)

Amidoschwarz-Waschlösung

Methanol	90 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**4 x Trenngelpuffer**

Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 mM
SDS	0,4 % (w/v)

4 x Sammelgelpuffer

Tris-HCl (pH 6,8)	500 mM
SDS	0,4 % (w/v)

10 x SDS-Laufpuffer

Tris	250 mM
Glycin	2 M
SDS	1 % (w/v)

Puffer für den Western Blot**Western Blot (WB)-Transferpuffer**

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,1 % (v/v)

Puffer für den immunologischen Nachweis von Proteinen**TBS**

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	150 mM

TBS-T

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	150 mM
Tween 80	0,1 % (v/v)

Blockierlösung

Magermilchpulver in TBS-T	5 % (w/v)
---------------------------	-----------

ECL-Lösung

Luminol in DMSO	5 mM
Cumarinsäure in DMSO	0,8 M
Tris-HCl pH 8,5	200 mM
H ₂ O ₂ (30 %)	1:1000

H₂O₂ wird kurz vor Gebrauch zur ECL-Lösung dazu gegeben. Die ECL-Lösung kann für eine Woche bei 4 °C gelagert werden.

7.9.2 NährmedienF/2-Medium:

Tropic Marin	1,66 % (w/v)
NaNO ₃ oder NH ₄ Cl	0,89 mM bzw. 1,5 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	36 µM
Tris (pH 8,0)	2 mM
F/2-Vitamine	1: 1000
F/2-Spurenelemente	1:1000

pH auf 8,0 einstellen

Für Festmedium: 1,3 % (w/v) Agar-Agar dazu geben

Vitaminlösung und Spurenelemente werden nach dem Autoklavieren dazu gegeben

F/2- Vitaminlösung:

Biotin	2 µM
Cyanocobalmin	0,37 µM
Thiamin-HCl	297 µM

F/2 Spurenelemente:

FeCl ₃	11,65 mM
Na ₂ EDTA	11,71 mM
CuSO ₄	39 µM
ZnSO ₄	77 µM
CoCl ₂	42 µM
MnCl ₂	910 µM
Na ₂ MoO ₄	26 µM

Luria Bertani (LB)-Medium:

Trypton/Pepton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)
dH ₂ O	ad 1 L

Für Festmedium: 1,5 % (w/v) Agar-Agar dazu geben

7.9.3 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/mL	50 µg/mL
Kanamycin	100 mg/mL	25 µg/mL
Zeocin	100 mg/mL	75 µg/mL

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Uwe Maier, der mir die Möglichkeit gegeben hat an einem sehr interessanten Thema arbeiten zu dürfen. Zudem möchte ich mich für seine themenbezogene Anregungen bedanken, die zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben sowie für die Bereitstellung der finanziellen Mittel und des Arbeitsplatzes im Labor.

Des Weiteren danke ich den Mitgliedern der Prüfungskommission Prof. Dr. Andreas Brune und Prof. Dr. Martin Thanbichler und besonders Prof. Dr. Susanne Önel für die Erstellung des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Stefan Zauner, der stets ein offenes Ohr für methodische und inhaltliche Fragen hatte und durch seine Denkanstöße einen wesentlichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen hat. Zudem möchte ich mich für die zahlreichen Diskussionen bedanken, für die Bereitstellung der Datensätze der *in silico* Analysen und vor allem für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Daniel Moog für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Für die gewissenhafte Arbeit möchte ich mich bei meinen Studenten Josefine Dersch, Katharina Puzik und Anna-Lena Zachert bedanken, die vor allem die *in vivo* Lokalisationsstudien meiner Arbeit vorangetrieben haben und mit denen nie Langeweile im Laboralltag aufkam. Vielen Dank auch an Dr. Simone Stork und Dr. Xianjuan Liu für die Bereitstellung ihrer Konstrukte.

Ich möchte außerdem auch allen Labormitgliedern danken, vor allem den ehemaligen Mitgliedern Dr. Julia Lau und Dr. Kathrin Bolte, die mir besonders in der Anfangszeit meiner Doktorarbeit geholfen haben, Dr. Thomas Heimerl für die TEM-Aufnahmen und Stephanie Morris, nicht nur für ihre direkte Art und den zahlreichen Anekdoten aus „alten Zeiten“, sondern auch für die Freundschaft, die durch die Zusammenarbeit im Labor entstanden ist. Vielen Dank an Angela Zimmer, für die leckeren Kuchen und für die vielen kleinen „nebensächlichen“ Arbeiten, die den Laboralltag vereinfachten.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die indirekte und direkte Unterstützung bedanken, vor allem bei Marius, der es während der Schreibphase dieser Arbeit sicherlich nicht leicht hatte.

Curriculum Vitae

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

„Die zentrale Vakuole von *Phaeodactylum tricornutum*: Charakterisierung und Untersuchung des Proteintransports“

Selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

Viktoria Schreiber